

Plasmaproteinadsorption auf kolloidalen Arzneistoffträgern

Analytik
Korrelation mit Oberflächeneigenschaften
Implikationen für das Drug Targeting

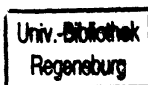
Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Torsten Blunk

Kiel 1994



23/V 15836



707096762^s

Referent: Prof. Dr. Rainer H. Müller

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Heber

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1994

Zum Druck genehmigt: 21.12.1994

*"If one wishes to carry out therapy
using synthetic pharmacological agents
it is first necessary to find moieties
which have a special affinity for a particular organ.*

*Having found them it is then possible
to use them as particles for carrying
therapeutically active groups to that organ."*

(Paul Ehrlich, 1906)

*"We may have to conclude that it is impossible
to stick anything into blood
or to stick blood into anything
without, eventually, the blood finding out."*

(Leo Vroman, 1987)

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz läßt nicht den Schluß zu, daß über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
 Theoretischer Teil		
2	Kolloidale Arzneistoffträger für die intravaskuläre Applikation	3
2.1	Mononukleäres phagozytäres System (MPS)	3
2.2	Ansätze für eine kontrollierte Arzneistoffabgabe	3
2.3	Modifikation der Arzneistoffträger-Eigenschaften zur Umgehung des MPS	5
2.4	Rolle der Plasmaproteine	8
3	Proteinadsorption an Grenzflächen	12
3.1	Grundlagen der Proteinadsorption	12
3.1.1	Ursachen der Proteinadsorption auf Grenzflächen	13
3.1.2	Adsorption in vielfältigen Zuständen ("multiple states")	16
3.1.3	Reversibilität der Adsorption	18
3.1.4	Kompetitive Adsorption und Adsorptionskinetik	18
3.2	Spezielle Oberflächen	23
3.2.1	Polystyrol	23
3.2.2	Polyethylenoxid	24
 Experimenteller Teil - Material und Methoden		
4	Verwendete potentielle Arzneistoffträger	28
4.1	Nanopartikel	28
4.2	Parenterale Fettemulsionen	29
4.2.1	Herstellung	30
4.2.1.1	Hochdruckhomogenisation	30
4.2.1.2	Rezepturen	30

4.3	Teilchengrößenanalytik	31
4.3.1	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	31
4.3.1.1	Grundlagen	31
4.3.1.2	Apparatur und Durchführung	33
4.3.2	Laserdiffraktometrie (LD)	34
4.3.2.1	Grundlagen	34
4.3.2.2	Apparatur und Durchführung	35
5	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)	37
5.1	Probenvorbereitung	37
5.1.1	Inkubation und Proteinadsorption	37
5.1.2	Separation: Zentrifugation und Filtration	39
5.1.3	Desorption und Vorbereitung für die IEF	39
5.1.4	Material	41
5.1.5	Durchführung: Kurzübersicht des Standardprotokolls	41
5.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	41
5.2.1	Grundlagen	41
5.2.2	Material	44
5.2.3	Durchführung	44
5.3	Transfer und SDS-PAGE	45
5.3.1	Grundlagen	45
5.3.2	Material	45
5.3.3	Durchführung	46
5.4	Silberfärbung	46
5.4.1	Grundlagen	46
5.4.2	Material und Durchführung	48
5.5	Laser-Densitometrie	48
5.5.1	Grundlagen	48
5.5.2	Gerät und Durchführung	49
5.6	Auswertung	49
5.6.1	Grundlagen	49
5.6.2	Qualitative Auswertung	52
5.6.3	Quantitative Auswertung	52

Experimenteller Teil - Ergebnisse und Diskussion

6	Entwicklung der 2D-PAGE-Analytik	54
6.1	Reproduzierbarkeit	54
6.2	Proteindesorption	58
6.3	Separation der Partikel vom Plasma	59
6.3.1	Zentrifugation	59
6.3.2	Filtration	63
6.3.3	Unterschiedliche Waschmedien	66
6.4	Inkubation der Partikel im Plasma	67
6.4.1	Verwendung der Plasmen unterschiedlicher Spender	67
6.4.2	Vergleich zwischen Frischplasma und gefrorenem Plasma	69
6.4.3	Einfluß der Plasmakonzentration (oder: ein einfacher Nachweis des "Vroman-Effekts")	72
7	Effekt der Oberflächenmodifikation auf die Proteinadsorption	77
7.1	Proteinadsorption auf den modifizierten Nanopartikeln	77
7.1.1	Durchführung und resultierende Adsorptionsmuster	77
7.1.2	Vorüberlegungen zur Auswertung	81
7.1.3	Qualitative Ergebnisse	82
7.1.4	Quantitative Ergebnisse	84
7.2	Untersuchung möglicher Korrelationen der Proteinadsorption mit den Oberflächeneigenschaften	86
7.2.1	Überzugsschichtdicke und Hydrophobie	86
7.2.2	Eigenschaften des Polyethylenoxids und Struktur der adsorbierten Block-Copolymere	88
7.2.2.1	Prinzipien der Reduktion der Proteinadsorption durch PEO	88
7.2.2.2	Die Proteinadsorptions-Theorie auf PEO-Oberflächen nach Jeon et al.	89
7.2.2.3	Das Poloxamer-Adsorptionsmodell nach Lee und Andrade	91

7.2.2.4	Mögliche Korrelationen der Proteinadsorption mit den Oberflächenstrukturen	93
7.3	Zusammenfassung	98
8	Proteinadsorptionskinetik	100
8.1	Adsorptionskinetik auf oberflächenmodifizierten Nanopartikeln	100
8.2	Zusammenfassung	106
9	60 nm Polystyrol-Partikel - eine Annäherung an die kontrollierte Arzneistoffabgabe und das Drug Targeting	107
9.1	Das Separationsproblem	107
9.1.1	Filtration und Zentrifugation	107
9.1.2	Der Plasmapellet	108
9.1.3	Immunglobulin G	111
9.2	Proteinadsorption auf modifizierten 60 nm Partikeln im Vergleich zu modifizierten 200 und 1000 nm Partikeln	113
9.2.1	Theoretische Voraussetzung	113
9.2.2	Unterschiede in der Proteinadsorption	114
9.2.3	Mögliche Korrelationen der Proteinadsorption mit den Oberflächeneigenschaften	115
9.3	Proteinadsorption auf PS 60-407 und PS 60-908	116
9.3.1	Der erste Vergleich	116
9.3.2	Adsorptionskinetik	119
9.3.3	Vergleich der Plasmen unterschiedlicher Spender	122
9.3.4	Proteinadsorption aus Kaninchenserum	124
9.3.5	Die Apolipoproteine	127
9.3.5.1	Mögliche Grundlagen der Adsorption	127
9.3.5.2	Mögliche Relevanz für das <i>In-vivo</i> -Verhalten	130
9.4	Zusammenfassung	134
10	Proteinadsorption auf Emulsionen	137
10.1	Separation vom Plasma	137

10.2	Emulsionen mit Block-Copolymeren als Emulgator	138
10.2.1	Größe der Oberfläche nach Separation vom Plasma	138
10.2.2	Proteinadsorption	139
10.2.2.1	Unterschiedliche Adsorptionsmuster auf den Emulsionen	139
10.2.2.2	Mögliche Korrelationen mit der Block-Copolymer-Oberfläche	142
10.2.2.3	Vergleich der Proteinadsorption auf Emulsionen und Nanopartikeln	146
10.3	Zusammenfassung	148
11	Zusammenfassung der Arbeit	150
12	Anhang	152
13	Literaturverzeichnis	160

Verwendete Abkürzungen

2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Apo	Apolipoprotein
BCA	Bicinchoninsäure
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
C	Vernetzungsgrad (" <i>Crosslinking</i> ") [%]
C3 α	Komplement C3 α
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propansulfat
cpm	<i>counts per minute</i>
DDS-Glas	Dimethyldichlorsilan-behandeltes Glas
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EO	Ethylenoxid
E-X	Emulsion, hergestellt mit Block-Copolymer X als Emulgator
Fibrinogen ext. γ	Fibrinogen <i>extended</i> γ -Kette
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic-Balance</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LDPE	Hochdruckpolyethylen
MG	Molekulargewicht
MPS	Mononukleäres phagozytäres System
NP 40	Nonidet P-40
O.D.	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDA	Piperazindiacylamid
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
PET	Polyethylenterephthalat
pI	Isoelektrischer Punkt
PO	Propylenoxid
PPO	Polypropylenoxid
PS 60	Polystyrolpartikel, Durchmesser 60 nm
PS 200	Polystyrolpartikel, Durchmesser 200 nm
PS 480	Polystyrolpartikel, Durchmesser 480 nm
PS 1000	Polystyrolpartikel, Durchmesser 1000 nm

PS X-Y	Polystyrolpartikel, Durchmesser X nm, modifiziert mit Block-Copolymer Y
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Totalacrylamid-Konzentration [%]
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VLDL	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Entwicklung kolloidaler Arzneistoffträger mit dem Ziel einer kontrollierten Arzneistoffabgabe bzw. eines zu einem Wirkort gerichteten Arzneistofftransports (Drug Targeting) findet ein weiterhin zunehmendes Interesse. Eine kontrollierte Wirkstoffabgabe im Blutkreislauf zirkulierender Arzneistoffträger kann gleichmäßige Blutspiegel über größere Zeiträume gewährleisten und die Anwendung von Arzneistoffen mit extrem kurzer Halbwertszeit, beispielsweise Peptiden, ermöglichen. Ein Drug Targeting ist besonders bei Arzneistoffen mit einem ausgeprägten Potential an schwerwiegenden Nebenwirkungen an anderen Organen als dem Zielorgan anzustreben, da der Arzneistoff gezielt zum Wirkort transportiert wird. Dadurch kann die zu applizierende Dosis erheblich reduziert werden, was zusätzlich für kostenintensive Wirkstoffe relevant ist.

Nach intravenöser Injektion hängt der Verbleib der Arzneistoffträger wesentlich von der Interaktion mit dem mononukleären phagozytären System (MPS) ab. Als körperfremd erkannte Trägersysteme werden überwiegend durch die Makrophagen der Leber und Milz aus der Blutbahn eliminiert, so daß für eine Therapie, die über die Erreichung dieser Organe hinausgeht, eine Umgehung des MPS angestrebt werden muß.

Ausgangspunkt der Arbeit war einerseits die Erkenntnis, daß das *In-vivo*-Verhalten intravenös injizierter Arzneistoffträger allein mit ihren physikochemischen Eigenschaften nicht hinreichend erklärbar ist (Müller, 1991). Es fehlte somit der Ansatzpunkt für eine rationale Entwicklung derartiger Systeme für die kontrollierte Arzneistoffabgabe bzw. ein Drug Targeting. Andererseits begann sich die Auffassung durchzusetzen, daß nach Injektion die Arzneistoffträger mit den Proteinen des Plasmas in Interaktion treten und die adsorbierten Proteine das *In-vivo*-Verhalten entscheidend beeinflussen können, wobei Kenntnisse über genaue Zusammenhänge gering waren (Juliano, 1988; Müller und Heinemann, 1989).

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein neues Verfahren zur Analytik der auf den Arzneistoffträgern adsorbierten Plasmaproteine zu entwickeln. Im Anschluß an eine spezielle Probenvorbereitung wurde dazu die hochauflösende zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet, die eine Identifizierung einzelner Proteine in einem Multikomponenten-Gemisch wie dem Plasma ermöglicht. Über die detaillierte Bestimmung der qualitativen Proteinadsorptionsmuster auf den

Arzneistoffträgern hinaus sollten vergleichende semi-quantitative Aussagen über die Zusammensetzung der adsorbierten Proteine gemacht werden. Ein weiteres Ziel war die Etablierung erster Korrelationen zwischen dem Proteinadsorptionsmuster und den Oberflächeneigenschaften der Arzneistoffträger. Als Modellpartikel dienten gut charakterisierte Polystyrol-Latexpartikel, die mit Block-Copolymeren modifiziert wurden. Insbesondere sollte die Auswirkung der Polyethylenoxid(PEO)-Ketten der Block-Copolymere auf die Proteinadsorption untersucht werden, da verschiedentlich bereits in einzelnen Studien die adsorptionsmindernde Wirkung des PEO beschrieben wurde (Jeon et al., 1991; Gombotz et al., 1992).

Es lagen *In-vivo*-Studien vor, in denen mit Block-Copolymeren modifizierte 60 nm Polystyrol-Partikel ein unterschiedliches Verhalten zeigten: Im Kaninchenmodell wurde mit Partikeln, überzogen mit Poloxamine 908, eine Zirkulation im Blutkreislauf erreicht (Illum et al., 1987), während mit Poloxamer 407 überzogene Partikel eine verstärkte Aufnahme ins Knochenmark zeigten (Illum und Davis, 1987). Selbst durch intensive physikochemische Charakterisierung konnten keine relevanten Unterschiede gefunden werden, die das unterschiedliche *In-vivo*-Verhalten der beiden ähnlichen Modellpartikel plausibel erklärt hätten (Müller, 1991). In der vorliegenden Arbeit sollte die Proteinadsorption auf entsprechenden Partikeln analysiert werden, um durch mögliche Unterschiede einen Ansatz zur Erklärung des Phänomens zu erhalten.

Abschließend sollte die Methode auf ein weiteres potentiellles Arzneistoffträgersystem, die parenteralen Fettemulsionen, übertragen werden. Die Verwendung der gleichen Block-Copolymere als Emulgator in den Emulsionen wie zur Modifikation der Polystyrol-Partikel ermöglichte einen Vergleich der beiden unterschiedlichen Systeme bezüglich ihrer Proteinadsorption.

Theoretischer Teil

2 Kolloidale Arzneistoffträger für die intravaskuläre Applikation

2.1 Mononukleäres phagozytäres System (MPS)

Das *In-vivo*-Verhalten der allermeisten intravaskulär applizierten kolloidalen Arzneistoffträger hängt in großem Maße von deren Interaktion mit dem MPS ab. Alle MPS-Zellen entstehen aus myeloischen Stammzellen des Knochenmarks und umfassen Gewebephagozyten wie die Kupffer-Zellen der Leber, Makrophagen der Milz und des Knochenmarks, Lymphmakrophagen, Langerhans-Zellen der Haut, Gehirn-Astrozyten und Blutmonozyten. Neben einer Reihe von anderen wichtigen biologischen Funktionen ist es Aufgabe der MPS-Zellen, partikuläre Strukturen aus dem Blutkreislauf zu eliminieren, so beispielsweise Proteinaggregate nach Gewebeerstörung und -reparatur, alternde Erythrozyten und eindringende Bakterien, Pilze und Viren (Becker, 1988). Genauso effizient werden jedoch auch kolloidale Arzneistoffträger, die als körperfremd erkannt werden, innerhalb weniger Minuten aus der Zirkulation eliminiert. Dabei wird der größte Anteil durch die Kupffer-Zellen der Leber (ca. 90%) und die Makrophagen der Milz (ca. 5%) aufgenommen, ein geringer Anteil durch die des Knochenmarks (O'Mullane et al., 1987). Die besonders ausgeprägte Aufnahme in Leber und Milz wird durch einen starken Blutstrom, eine fenestrierte Vaskulatur und eine große Zahl an MPS-Zellen hervorgerufen. Die Phagozytose der Arzneistoffträger durch die MPS-Zellen steht einerseits im engen Zusammenhang mit ihren Oberflächeneigenschaften (Müller, 1991), andererseits wird sie durch Opsonisierung beeinflusst, d. h. die Adsorption von die Phagozytose fördernden Plasmaproteinen (Juliano, 1988).

2.2 Ansätze für eine kontrollierte Arzneistoffabgabe

Unterschiedliche Wege können beschritten werden, um eine kontrollierte Arzneistoffabgabe intravaskulär applizierter Trägersysteme zu bewirken. Die vorliegende Arbeit untersucht den Ansatz der gezielten Modifikation der physikochemischen Eigenschaften von Arzneistoffträgern. Um diesen

Ansatz in das große Feld des "Controlled Drug Delivery" besser einordnen zu können, wird hier eine kurze Übersicht über angewandte Prinzipien gegeben. Sie erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und streift die übrigen Ansätze nur am Rande.

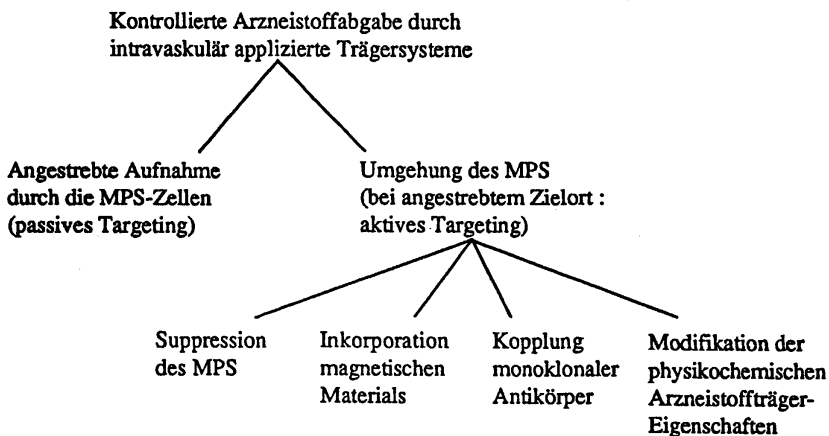


Abb. 2.2 /1: Mögliche Wege für eine kontrollierte Arzneistoffabgabe bzw. ein Drug Targeting durch intravaskulär applizierte kolloidale Arzneistoffträger.

Die effiziente Aufnahme intravenös injizierter Partikel in Zellen des MPS kann für ein passives Drug Targeting ausgenutzt werden, beispielsweise für die Behandlung von Leishmaniasen, Tuberkulose, Lepra und Leptospirosen (Fidler und Hart, 1982; Couvreur et al., 1991). Einem gezielten Targeting zu anderen Zellen als denen des MPS oder auch einer ungehinderten Blutzirkulation steht die MPS-Aufnahme in Leber und Milz jedoch als großes Hindernis im Wege (Poste und Kirsh, 1983), so daß zahlreiche Studien unternommen worden sind, um Möglichkeiten zur Umgehung des MPS zu finden.

So konnte die Suppression des MPS beispielsweise mit Polystyrol-Partikeln demonstriert werden (Illum et al., 1986), was Einsichten in die Funktionsweise des Systems ermöglicht, für eine therapeutische Anwendung jedoch nicht einsetzbar ist, da wiederholte Suppression das MPS in seinen sonstigen Funktionen erheblich beeinträchtigen würde.

Mit Magnetit versetzte Partikel sollen durch externe Führung mittels Magneten zu ihrem Zielort gelangen. Trotz einiger aussichtsreicher Tierstudien (Ibrahim et al., 1982; Gupta und Hung, 1990) bleibt diese Möglichkeit auf Gewebe beschränkt, die einem anzulegenden Magnetfeld leicht zugänglich sind. Eine längere Anwendung in tiefergelegenen Geweben im Menschen erscheint kaum möglich.

Großes Interesse fand auch die Bindung monoklonaler Antikörper an kolloidale Träger, die *in vitro* spezifisch zu den Tumor-Targetzellen gelangten (Illum et al., 1983; Rolland et al., 1987; Akasaka et al., 1988). *In vivo* jedoch zeigten bisherige Versuche kein Targeting zu den angestrebten Tumorzellen, sondern statt dessen wiederum eine Aufnahme der Träger in Leber und Milz (Illum et al., 1984; Akasaka, 1988).

2.3 Modifikation der Arzneistoffträger-Eigenschaften zur Umgehung des MPS

Ein vielversprechender und häufiger Ansatz, um die Arzneistoffträger vor der Aufnahme durch MPS-Zellen zu schützen, ist die Modifikation ihrer physikochemischen Eigenschaften. Gelingt auf diese Weise sogar ein Dirigieren zu bestimmten Zielorten im Körper, handelt es sich, genau wie bei der Verwendung monoklonaler Antikörper, um ein aktives Targeting (Davis und Illum, 1986).

Schon früh wurde die Abhängigkeit der Phagozytose von den Oberflächeneigenschaften wie Ladung und Hydrophobie bzw. der Größe untersucht (Wilkins und Myers, 1966; Van Oss et al., 1975; Zilversmit et al., 1952). Seitdem sind diese Phänomene in zahlreichen Publikationen behandelt worden. Müller faßt seine umfangreichen Studien zur physikochemischen Charakterisierung in einem Katalog von Anforderungen an potentielle kolloidale Arzneistoffträger zusammen. Für die Umgehung des MPS sind demnach u.a. eine niedrige Ladung, eine hydrophile Oberfläche und eine geringe Proteinadsorption erforderlich, weiterhin ist die chemische Struktur wesentlich, wobei insbesondere Polyethylenoxid-Ketten an der Oberfläche empfohlen werden. Allerdings führt selbst die Erfüllung aller Kriterien nicht zwangsläufig zu einer Umgehung des MPS (Müller, 1991). Im folgenden soll in aller Kürze eine Auswahl an relevanten *In-vivo*-Studien vorgestellt werden.

Nanopartikel

Die Partikelaufnahme in Leber und Milz konnte vermieden werden durch den Überzug von Polystyrol-Partikeln (PS) mit Block-Copolymeren der Poloxamer- und Poloxamin-Reihe. Grob vereinfacht adsorbieren diese auf den Partikeln mit ihrem hydrophoberen Polypropylenoxid-Mittelteil (PPO), während die hydrophileren Polyethylenoxid-Seitenketten (PEO) nach außen abstehen und den Partikeln eine deutlich hydrophilere Oberfläche verleihen. Durch die Modifikation von 60 nm PS-Partikeln mit Poloxamine 908 wurde im Kaninchenmodell eine deutlich verlängerte Zirkulation im Blutkreislauf erreicht, nach acht Tagen war eine immer noch reduzierte Leberaufnahme zu verzeichnen (Illum et al., 1987). Mit Poloxamer 407 überzogene Partikel zeigten dagegen eine Anreicherung im Knochenmark (Illum und Davis, 1987), wobei inzwischen gezeigt werden konnte, daß die Aufnahme in die dortigen Endothelzellen erfolgt (Porter et al, 1992). Die durch Modifikation auch mit anderen, insbesondere hochmolekularen Poloxameren wiederholt beobachtete Reduktion der MPS-Aufnahme wird allgemein auf die Hydrophilie der Partikel und die Schichtdicke des Überzugs zurückgeführt. Trotz intensiver physikochemischer Charakterisierung konnte bisher jedoch keine Erklärung für das unterschiedliche *In-vivo*-Verhalten der beiden oben genannten sehr ähnlichen Partikel gefunden werden (Müller, 1991).

Seit dieser erfolgreichen Umgehung des MPS wird verstärkt versucht, die Ergebnisse von den nichtabbaubaren Polystyrol-Partikeln auf biologisch abbaubare Träger zu übertragen. So erzielten beispielsweise Tröster et al. (1992) mit durch Poloxamine 1508 überzogenen Polymethyl-methacrylat-Partikeln (PMMA) vorübergehend höhere Dosen im Blut als mit unmodifizierten Partikeln und eine Erhöhung der Aufnahme in die Milz bei gleichzeitig verringerter Leberaufnahme. Nach 6 h waren jedoch insgesamt in den MPS-Zellen gleich hohe Anteile an der Gesamtdosis für modifizierte und unmodifizierte Partikel zu beobachten.

Kürzlich demonstrierten Gref et al. (1994) mit Polylactid-glycolid(PLGA)-Partikeln, an die kovalent Polyethylenoxid-Ketten gebunden waren, im Mäusemodell verlängerte Zirkulationszeiten und verringerte Leberaufnahme gegenüber der Kontrollgruppe nach 5 h, wobei die längsten verwendeten PEO-Ketten am effektivsten waren.

Liposome

Die meisten Untersuchungen zur Umgehung des MPS wurden mit Liposomen durchgeführt. Mehrere Studien konnten eine verlängerte Zirkulation im Blutkreislauf zeigen (z. B. Gabzion und Papahadjopoulos, 1988; Allen et al., 1989; Blume und Cevc, 1990; Woodle et al., 1991), teilweise

über 24 h hinaus. Dies wurde erst möglich, als die Oberfläche konventioneller Liposome durch die Inkorporation von Monosialogangliosiden, Phosphatidylinositol, Sulfatiden oder wiederum PEG modifiziert wurde, insbesondere in Kombination mit rigiden Bilayern, die Cholesterol, Sphingomyelin und/oder andere festigende Phospholipide enthielten (Nässander et al., 1990; Allen, 1994).

Emulsionen

Mit Fettemulsionen ist es ebenfalls möglich, die MPS-Aufnahme zu reduzieren. Dabei ist zu beachten, daß Fettemulsionen mit Phospholipiden als Emulgator als Nachbildungen der Chylomikronen betrachtet werden können, was ihr *In-vivo*-Verhalten stark beeinflusst (Illum et al., 1989). Bereits 1975 fanden Jeppsson und Rössner für Emulsionen, die mit Poloxameren stabilisiert waren, eine reduzierte Elimination aus dem Blutkreislauf gegenüber eilecithin-stabilisierten Formulierungen. Davis und Hansrani (1985) konnten *in vitro* die Abhängigkeit der Phagozytose von der Oberfläche der Emulsionströpfchen, d. h. vom Emulgator, zeigen. Mit einer mit Poloxamine 908 stabilisierten Fettemulsion wurde eine Reduktion der Leber/Milz-Aufnahme und eine verlängerte Zirkulationszeit erreicht, wiederum gegenüber Emulsionen mit Eilecithin als Emulgator (Illum et al., 1989).

Es liegen also diverse *In-vivo*-Studien vor, die teilweise vielversprechende Resultate zur Umgehung des MPS liefern. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf sinnvolle biologisch abbaubare Formulierungen, die spezifisch bestimmte Zielzellen ansteuern, ist aber weiterhin ein schwierig zu erreichendes Ziel. Lange Zeit wurde der Ansatz verfolgt, die beobachteten Organverteilungen unmittelbar auf die Eigenschaften der Arzneistoffträger zurückzuführen. Umfangreiche Oberflächencharakterisierungen führten so auch zu oben aufgezeigten Tendenzen, eine rationale und zwingende Entwicklung ist damit jedoch nicht möglich, da detaillierte Korrelationen zwischen Trägereigenschaften und *In-vivo*-Verhalten bis jetzt fehlen (Abb. 2.3 /1).

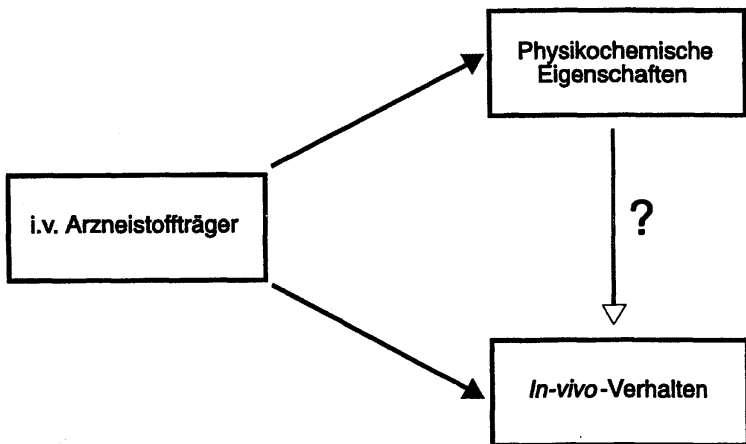


Abb. 2.3 /1: Das *In-vivo*-Verhalten umfassend charakterisierter Arzneistoffträger kann vielfach nicht durch ihre Eigenschaften erklärt werden. Das Fehlen detaillierter Korrelationen zwischen Trägereigenschaften und Organverteilung macht eine rationale Entwicklung allein auf der Basis physikochemischer Charakterisierung unmöglich.

2.4 Rolle der Plasmaproteine

Durch das ständig wachsende Wissen über das Verhalten von Proteinen an Grenzflächen (Andrade, 1985; Norde, 1986; Horbett und Brash, 1987) wurden die Proteine des Blutes als beeinflussender Faktor im Drug Targeting mehr und mehr in Betracht gezogen. Dabei wurde vielfach, auch aufgrund noch geringer detaillierter Kenntnisse, eine allgemeine Reduktion der Proteinadsorption angestrebt, um so die die Phagozytose durch die MPS-Zellen fördernde Opsonisierung zu vermindern. Inzwischen tritt der qualitative Aspekt stärker in den Vordergrund, es wird immer häufiger folgende Auffassung vertreten:

- Nach intravenöser Injektion treten die Arzneistoffträger (alle) mit den Proteinen des Plasmas in Interaktion.
 - Die qualitative Zusammensetzung der adsorbierten Plasmaproteine hängt von den Oberflächeneigenschaften der Arzneistoffträger ab.
 - Die adsorbierten Plasmaproteine bestimmen entscheidend das *In-vivo*-Verhalten der Arzneistoffträger.
- (Juliano, 1988; Müller und Heinemann, 1989; Davis et al., 1993).

Für MPS-Zellen verdichtet sich die Erkenntnis, daß bestimmte Protein-Rezeptoren auf der Oberfläche in variierendem Ausmaß in den unterschiedlichen Makrophagensubpopulationen ausgebildet werden. Für einen gegebenen Zelltyp kann die Rezeptorexpression dabei eine Funktion der Differenzierungsstufe sein (Becker, 1988; Gordon et al., 1988). Darauf aufbauend entwickelte Müller ein theoretisches Konzept, daß die gezielte Oberflächenmodifikation der Arzneistoffträger vorsieht, um durch präferentielle Adsorption bestimmter Plasmaproteine das gewünschte *In-vivo*-Verhalten hervorzurufen. Je nach Art der adsorbierten Proteine (MPS-Aufnahme fördernde Opsonine oder andere Proteine) wird zwischen "Differentieller Opsonisierung" und "Differentieller Adsorption" unterschieden (Müller und Heinemann, 1989; Müller, 1991).

Diverse Plasmaproteine sind auf unterschiedlichsten Systemen (Bakterien, Arzneistoffträger u.a.), meist *in vitro*, bezüglich ihrer Rezeptoren oder ihrer Auswirkung auf die Phagozytose untersucht worden. Als Opsonine werden die Komponenten des Komplementsystems (Komplementkaskade) eingestuft, d.h. durch ihre Adsorption wird die Phagozytose gefördert (Artursson und Sjöholm, 1986; Kazatchkine und Carreno, 1988; Scieszka et al., 1991; Labarre et al., 1993). Ebenfalls opsonisierend wirken Immunglobulin G (Hsu und Juliano, 1982; Mehta et al., 1984) und Fibronectin (Gudewicz et al., 1980; Hsu und Juliano, 1982; Pommier et al., 1984). Weitere Rezeptoren werden beispielsweise für Fibrinogen (Sherman und Lee, 1977; Altieri et al., 1986), Transferrin (Andreesen et al., 1984; Vogel et al., 1987) und α 2-Macroglobulin beschrieben (Kaplan und Neilsen, 1979; Van Leuven et al., 1986). Eine Übersicht über Plasmamembranrezeptoren des MPS geben Gordon et al. (1988). Die Adsorption von Apolipoproteinen kann gleichfalls große Auswirkungen auf das *In-vivo*-Verhalten haben. Interaktionen mit Liposomen (Juliano, 1988) und Emulsionen (Carpentier, 1989) sind aufgrund derer Ähnlichkeit mit den endogenen Lipoproteinen gut erklärbar und können die Arzneistoffträger verstärkt den Wegen des Fettmetabolismus zuführen. Insgesamt ist das Wissen über existierende Rezeptoren eher lückenhaft, stellt allerdings ein aktiv beforschtes Gebiet dar, so daß mit ständig wachsenden Erkenntnissen zu rechnen ist.

Im Gegensatz zu den verschiedensten Erkennungsmechanismen sollte für alle Arzneistoffträger aber auch eine mögliche Schutzwirkung gegenüber dem MPS durch adsorbierte Proteine in Betracht gezogen werden.

Insbesondere für Liposome und z.T. auch für Emulsionen ist zu beachten, daß eine Wechselwirkung mit Komponenten des Plasmas leicht eine

Destabilisierung auslösen und zu einer verfrühten Freisetzung des Arzneistoffs führen kann (Juliano, 1988).

Verschiedene Studien haben versucht, sich die Erkenntnisse über mögliche Einflüsse von Proteinen auf den Arzneistoffträgern zunutze zu machen. So erreichten beispielsweise Kreuter und Borchard (1992) durch einen Überzug mit Serumalbumin auf PMMA-Partikeln vor Injektion eine Veränderung des *In-vivo*-Verhaltens, das Albumin soll hier eine Schutzfunktion vor Interaktion mit opsonisierenden Komponenten besitzen. Die mögliche Relevanz der Apolipoproteine wird durch den Einsatz endogener Lipoproteine als potentielle Arzneistoffträger verdeutlicht. Durch geschickte Modifikation gelang *in vitro* jeweils eine spezifische Aufnahme in die unterschiedlichen Zelltypen der Leber, d.h. nicht nur in die Kupffer-Zellen, sondern auch in Parenchym- und Endothelzellen (Van Berkel, 1993).

Moghimi und Patel (1988; 1989a) beschrieben unterschiedliche Opsonine, die *in vitro* in Zellkulturen differenziert zu einer Aufnahme in die Kupfferzellen (cholesterol-arme Liposome) bzw. in phagozytierende Zellen der Milz (cholesterol-reiche Liposome) führten, jedoch nicht näher identifiziert wurden. Diese Opsonine scheinen keine Affinität für mit Sphingomyelin versetzte Liposome zu besitzen, die statt dessen Dysopsonine adsorbieren, die eine Leberaufnahme verhindern (Moghimi und Patel, 1989b).

Ein wesentlicher Beweggrund für den Beginn des in dieser Arbeit geschilderten Projektes war die Diskrepanz zwischen sehr ähnlichen Oberflächencharakteristika und unterschiedlichem *In-vivo*-Verhalten der oben beschriebenen Polystyrol-Partikel, überzogen mit Poloxamine 908 (Blutzirkulation) und Poloxamer 407 (Endothelzellen des Knochenmarks) (Illum et al, 1987; Illum und Davis, 1987). Gemäß dem Konzept der *differentiellen Adsorption* wurde die Hypothese aufgestellt, daß die detektierten geringfügigen Unterschiede der Oberflächeneigenschaften oder - wahrscheinlicher - undetektierte Unterschiede der PEG-Ketten-Konformation zu differenzierter Adsorption von Plasmaproteinen führen, die ihrerseits das *In-vivo*-Verhalten entscheidend beeinflussen kann.

Auch Davis et al. (1993) vermutet explizit eine Adsorption von Plasmakomponenten, die die Aufnahme ins Knochenmark vermitteln. Bisherige Versuche zur Detektion unterschiedlicher Proteinadsorption auf den beiden Partikeln schlugen jedoch fehl (Norman et al., 1993a). Einen Beitrag zur Aufklärung der Problematik leistet diese Arbeit.

Da also der qualitativen Zusammensetzung der adsorbierten Plasmaproteine eine ausschlaggebende Rolle zugeschrieben wird, ist ihre Analytik von essentieller Bedeutung. Jedoch liegen bis jetzt nur wenige Untersuchungen vor, die zudem aufgrund geringer Auflösung der verwendeten Methoden wenig detaillierte Aussagen machen konnten (siehe Kapitel 3). In vorliegender Arbeit wird die Entwicklung einer qualitativen Analytik dargestellt, die darüber hinaus semiquantitative Aussagen ermöglicht. Es wird sich dabei der Methode bedient, die für eine komplizierte Proteinmischung wie dem menschlichen Plasma die höchste Auflösung bietet, der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE).

Über die Entwicklung der Analytik hinaus wird die Möglichkeit untersucht, die adsorbierten Plasmaproteine mit den Oberflächeneigenschaften der Arzneistoffträger in Beziehung zu setzen. Zusätzlich sollen Wege aufgezeigt werden, an deren Ende die Korrelationen zwischen adsorbierten Proteinen und *In-vivo*-Verhalten der Arzneistoffträger stehen könnten. Die Arbeit versteht sich als Beitrag, die Lücke in der Korrelationskette von Oberflächeneigenschaften und *In-vivo*-Verhalten zu schließen.

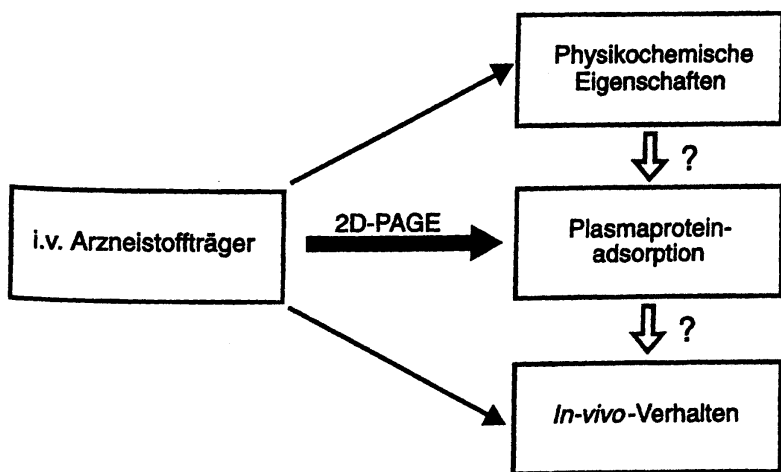


Abb. 2.4 /1: Auf Arzneistoffträgern adsorbieren abhängig von ihrer Oberfläche bestimmte Plasmaproteine, die ihrerseits für das *In-vivo*-Verhalten verantwortlich sein können. Vorliegende Arbeit untersucht durch die Proteinanalytik mittels 2D-PAGE die Möglichkeit Korrelationen zu etablieren.

3 Proteinadsorption an Grenzflächen

Das Verhalten von Proteinen an Grenzflächen spielt eine bedeutende Rolle sowohl in natürlichen als auch in technischen Prozessen. Natürlicherweise sind hier insbesondere die Funktion in biologischen Membranen und deren Umgebung und das Vorkommen verschiedener Enzyme an Phasengrenzen zu nennen.

In technischen und medizinischen Anwendungen kommt es in vielen Fällen zu beabsichtigten oder unbeabsichtigten Interaktionen zwischen Proteinen und Grenzflächen. So werden die Proteine als Stabilisatoren bzw. Emulgatoren kolloidaler Dispersionen in Nahrungsmitteln, kosmetischen und pharmazeutischen Produkten verwendet. Andererseits hat die Proteinadsorption im Frühstadium der Anlagerung von biologischen Komponenten auf Oberflächen vermittelnde Wirkung: Auf die ursprünglich adsorbierte Proteinschicht können sich nachfolgend biologische Zellen (Bakterien, Blutzellen) anlagern, was beispielsweise in Nahrungsmittel verarbeitenden Anlagen oder künstlichen Organen in hohem Maße unerwünscht ist (Norde, 1986).

Auf dem medizinischen bzw. pharmazeutischen Sektor sind insbesondere die Biokompatibilität von künstlichen Organen, Implantaten und kolloidalen Arzneistoffträgern von Bedeutung (Norde, 1986; Brash, 1987; Juliano, 1988), wobei jeweils die Adsorption körpereigener Proteine von großer Relevanz sein kann. Zu nennen sind hier u.a. Thrombusentwicklung, Aktivierung des Komplementsystems und Erkennung durch das Mononukleäre Phagozytäre System (MPS).

3.1 Grundlagen der Proteinadsorption

Proteine sind Copolymere aus verschiedenen Aminosäuren, die durch Polykondensation Polypeptidketten bilden. Die Aminosäuresequenz der Polypeptidketten, die Primärstruktur der Proteine, legt bereits die weiteren Eigenschaften der Proteine fest. Die Seitenketten der Aminosäuren variieren in ihrer Hydrophobie, einige sind sauer oder basisch, wodurch ein ambivalentes und amphiphiles Molekül entsteht.

Die Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Peptideinheiten führt zu Helix- oder Faltblattstrukturen (Sekundärstruktur), die wiederum der räumlichen Auffaltung der Ketten (Tertiärstruktur) zugrundeliegt. Des weiteren wird die Tertiärstruktur von den Aminosäure-Seitenketten beeinflusst, wobei insbesondere Wasserstoff-

Brückenbindungen, Disulfid-Bindungen, Ionenbeziehungen und hydrophobe Bindungen eine Rolle spielen. Die Zusammenlagerung globulärer Proteine zu noch höheren Aggregaten wird als Quartärstruktur bezeichnet (Karlson, 1994). Eine detaillierte Betrachtung der Bindungsarten und -kräfte findet sich beispielsweise bei Norde (1986).

Bezüglich ihrer räumlichen Anordnung können drei Typen von Proteinen unterschieden werden: (i) stark solvatisierte und flexible Moleküle mit einer zufälligen Knäuelstruktur (meist denaturiert), (ii) Moleküle mit einem regelmäßigen Aufbau wie α -Helix oder β -Faltblatt (fibrilläre Proteine u.a. in Stützgewebe) und (iii) die kompakten globulären Proteine mit α -Helix-, β -Faltblatt- und zufälligen Strukturen, die den Hauptanteil der Proteine ausmachen. Aufgrund der oben angesprochenen vielfältigen Bindungsarten, die für die spezifischen Strukturen insbesondere der globulären Proteine verantwortlich sind, kann eine generelle Theorie zur Beschreibung der Proteinadsorption heutzutage noch nicht aufgestellt werden (Norde, 1986), wenn dies überhaupt jemals möglich sein wird. Dennoch soll hier ein Überblick über bisher bekannte allgemeingültige Prinzipien, die der Proteinadsorption zugrunde liegen, gegeben werden.

3.1.1 Ursachen der Proteinadsorption auf Grenzflächen

Molekülgröße

Die Größe ist insofern von Bedeutung, als daß Proteine oder auch andere Makromoleküle vielfältige Kontaktpunkte bei der Adsorption an eine Oberfläche ausbilden können. Die typischerweise beobachtete Irreversibilität der Proteinadsorption in dem Medium, aus dem heraus adsorbiert wurde, wird auf die unwahrscheinliche simultane Dissoziation aller Bindungsstellen zurückgeführt (Horbett und Brash, 1987). Allerdings sollte die Bedeutung der Größe nicht zu hoch eingeschätzt werden, da beispielsweise für Hämoglobin (MG 65.000) eine erheblich höhere Oberflächenaktivität als für Fibrinogen (MG 330.000) ermittelt wurde, während nur geringe Änderungen der Aminosäuresequenz des Hämoglobins bei gleichbleibendem Molekulargewicht deutliche Änderungen der Oberflächenaktivität nach sich zogen (Horbett, 1987).

Ladung

Die Ladung und Ladungsverteilung beeinflussen die Oberflächenaktivität, da die meisten der geladenen Aminosäuren auf dem Äußeren des Proteinmoleküls sitzen. Es kommt somit zwangsläufig zu einer Annäherung

dieser geladenen Residuen an eine potentielle Adsorbensoberfläche. Experimentell wurde eine höhere Adsorptionsrate am oder in der Nähe des isoelektrischen Punktes gefunden, was eventuell auf eine minimierte Abstoßung der adsorbierenden Moleküle untereinander zurückzuführen ist (Horbett und Brash, 1987). Dagegen schloß Norde (1986), daß eine reduzierte Adsorption bei Entfernung vom isoelektrischen Punkt nicht aus einer Abstoßung aufgrund der Ladung resultierte, sondern aus strukturellen Veränderungen des Proteins.

Die Allgemeingültigkeit der Abhängigkeit der Adsorption vom isoelektrischen Punkt ist ohnehin fraglich, da es wahrscheinlich ist, daß lokale Bereiche positiver und negativer Ladung des Proteins als unabhängige Bindungsstellen fungieren können.

Besonders wichtig wird die Ladung der Proteine bei Annäherung an eine ebenfalls geladene Oberfläche. Die Adsorption wird stark beeinflusst vom Ausmaß der gegensätzlichen Ladung und der Konkurrenz durch gleichgeladene Ionen des Mediums. Weiterhin kann es zu divalenter kationischer Brückenbildung zwischen einer negativen Ladung des Proteins und einer negativen Ladung der Oberfläche kommen (Horbett und Brash, 1987).

Chemische Zusammensetzung (Amphipathie)

Chemische Unterschiede, hervorgerufen durch das für jedes Protein typische Verhältnis der Aminosäuren, sind ebenfalls von Bedeutung für die Oberflächenaktivität der Proteine. Die hydrophoben, hydrophilen und geladenen Seitenketten der Aminosäuren mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen ermöglichen Bindungen zu Oberflächen mit beträchtlich unterschiedlicher chemischer Natur. Das bedeutet für eine bestimmte Oberfläche, daß einige Proteine mehr Residuen besitzen, die eine Bindung an die auf der Oberfläche vorherrschenden Bindungsstellen begünstigen, und somit oberflächenaktiver sind als andere (Horbett und Brash, 1987).

Hydrophobie

Hydrophobe Wechselwirkungen liefern einen gewichtigen Beitrag zur Interaktion von Proteinen und Oberflächen. Die Dehydratation der jeweiligen hydrophoben Bereiche wird durch den resultierenden Entropiegewinn hervorgerufen und fördert somit eine spontane Adsorption (Norde, 1986, s.u.).

In der Regel steigt mit zunehmender Oberflächenhydrophobie die Menge adsorbierten Proteins (MacRitchie, 1972; Cuypers et al., 1977; Jönsson et al., 1982; Penners et al., 1981; van Dulm und Norde, 1983). Umgekehrt sind

hydrophobere Proteine im allgemeinen oberflächenaktiver (Horbett und Brash, 1987).

Intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen sind von Bedeutung für die Stabilisierung globulärer Proteine. Bei Adsorption aus einem wäßrigen Milieu an eine Oberfläche können sich die inneren apolaren Bereiche zum Adsorbens hin orientieren, womit sie nach wie vor vom wäßrigen Medium abgeschirmt sind. Für Proteine mit hohem Anteil der intramolekularen hydrophoben Kräfte gegenüber geringerem Anteil anderer stabilisierender Faktoren konnten Birdi (1973), Norde und Lyklema (1978a-e) und Norde (1986) eine stärkere Tendenz zu Strukturveränderungen dieser Proteine während einer Adsorption zeigen. Bei vorherrschenden stabilisierenden Kräften anderer Art wirkt sich der Verlust der intramolekularen hydrophoben Kräfte nicht so stark aus, die Struktur bleibt hier eher erhalten.

Löslichkeit

Die Löslichkeit eines Proteins in seinem Medium kann einen Beitrag zur Oberflächenaktivität leisten. Schlechte Löslichkeit erhöht die Adsorptionsbereitschaft (Horbett und Brash, 1987).

Strukturelle Faktoren

Wenig Genaues ist bisher bekannt über die vielfältigen Einflüsse, die die Proteinstruktur auf die Adsorption nehmen kann, obwohl sich bereits in den siebziger Jahren Hinweise darauf aus Experimenten mit genetischen Varianten des Hämoglobins ergaben (Asakura et al., 1974; Ohnishi und Asakura, 1976; Elbaum et al., 1976). Es wurden teilweise große Unterschiede in der Oberflächenaktivität beobachtet, die aus dem Austausch einzelner Aminosäuren resultierten, der die oben beschriebenen generellen Eigenschaften der Proteine schwerlich verändern konnte. Vielmehr wurde eine Veränderung der Stabilität bzw. dreidimensionalen Struktur der Proteine beobachtet, wobei eine geringere Stabilität eine höhere Oberflächenaktivität nach sich zog.

Allgemein sind wahrscheinlich Proteine, die stärker zu Entfaltungen ihrer Struktur neigen, oberflächenaktiver, da sie mehr Bindungsstellen ausbilden können. Dagegen könnten Proteine, die durch Disulfidbrücken quervernetzt sind und sich daher weniger stark entfalten können, eine geringere Oberflächenaktivität besitzen (Horbett und Brash, 1987).

Entropiegewinn

Das tatsächliche Eintreten einer Proteinadsorption wird bestimmt durch die Gibbssche Energie des Prozesses, $\Delta_{\text{ads}}G$. Eine spontane Adsorption

vollzieht sich nur bei $\Delta_{\text{ads}}G < 0$. Für eine thermodynamische Analyse ist die Ermittlung der Adsorptionsenthalpie, $\Delta_{\text{ads}}H$, und der Adsorptionsentropie, $\Delta_{\text{ads}}S$, von Interesse. Bei einer gegebenen Temperatur gilt $\Delta_{\text{ads}}G = \Delta_{\text{ads}}H - \Delta_{\text{ads}}S$.

Eine direkte Ermittlung von $\Delta_{\text{ads}}S$ ist aufgrund der unendlichen strukturellen Variationen, sowohl der Proteine als auch der Lösungsmittelmoleküle, nicht möglich. Bei konstantem Druck entspricht jedoch $\Delta_{\text{ads}}H$ der Adsorptionswärme und kann somit mittels (Mikro-)Kalorimetrie ermittelt werden. Für ihre Modellproteine fanden Norde und Lyklema (1978e), Koutsoukos et al. (1983) und Norde et al. (1986) unter unterschiedlichsten Bedingungen $\Delta_{\text{ads}}H > 0$, was einen Entropiegewinn als Triebfeder für die Proteinadsorption impliziert: $\Delta_{\text{ads}}S > 0$.

Beispielsweise könnten, wie bereits oben angesprochen, intramolekulare hydrophobe Kräfte durch die Adsorption erheblich abgeschwächt werden und sich daraus für die vorher stabilisierten Strukturen (α -Helix, β -Faltblatt) neue Rotationsfreiheiten ergeben. Der daraus resultierende Entropiegewinn ist möglicherweise einer der Hauptfaktoren für eine spontane Proteinadsorption (Norde et al., 1987).

Detailliertere Betrachtungen der Ursachen der Proteinadsorption finden sich u.a. bei Norde (1986) und Horbett und Brash (1987).

3.1.2 Adsorption in vielfältigen Zuständen ("multiple states")

Seit Mitte der achtziger Jahre wird verstärkt die Idee vertreten, daß adsorbierte Proteine nicht nur in einem Zustand existieren können, sondern in vielfältigen. Dies soll anhand der zugrundeliegenden möglichen Mechanismen nach Horbett und Brash (1987) verdeutlicht werden.

1. Die Adsorption eines Proteins an eine Bindungsstelle kann beeinflusst werden durch bereits adsorbierte Proteine in der Nachbarschaft, entweder durch geometrische Reduktion des zur Verfügung stehenden Platzes oder durch Abstoßungskräfte bei entsprechend dichter Annäherung. Während ein insgesamt oval erscheinendes Protein beispielsweise ansonsten mit seiner langen Seite adsorbiert ("side-on"), könnte es unter diesen Umständen eher mit der spitzeren Seite adsorbieren ("end-on"), um sich noch zwischen bereits vorhandene Proteine zu begeben.

Viele der vorher vorherrschenden Adsorptionsmodelle berücksichtigten diese Heterogenität nicht, sondern waren auf dem ursprünglich für die Gasadsorption entwickelten Langmuir-Modell aufgebaut. Dieses Modell geht jedoch von sehr kleinen, ungeladenen und über die gesamte Oberfläche einheitlichen Teilchen aus, die ohne Interaktion untereinander und ohne Veränderungen auf einer homogenen Oberfläche adsorbieren. Es ist damit in keiner Weise ein realistisches Modell für die Proteinadsorption, was davor bewahren sollte, zufälligerweise passende experimentelle Adsorptionsisothermen im Sinne dieses Modells zu interpretieren (Norde, 1986).

2. Es können mehrere strukturell unterschiedliche Formen eines Proteins adsorbiert auf einer Oberfläche koexistieren. Einerseits können sie bereits in der ursprünglichen Bulkphase bestehen, wobei der Anteil der Fraktionen vom jeweiligen Energiezustand abhängt, der auch die Adsorption beeinflussen wird. Zum anderen kommt es aber auch zu Veränderungen der Struktur durch die Adsorption, sowohl zu schnellen bei der Adsorption selbst als auch zu langsamen nach bereits erfolgter Adsorption. Hierbei sind wieder die bereits oben angesprochenen Triebkräfte zu berücksichtigen, beispielsweise die Exposition sonst innenliegender hydrophober Residuen, die nun als Bindungsstellen zur Verfügung stehen, oder der aus strukturellen Veränderungen resultierende Entropiegewinn. Die Fraktionen der jeweiligen Zustände variieren mit der Zeit, der Temperatur und der Adsorbensoberfläche, was anhand von Experimenten bezüglich der Eluierbarkeit mit Tensiden von Bohnert und Horbett (1986), Rapoza und Horbett (1990) und Ertel et al. (1991) gezeigt werden konnte.

3. Eine weitere Ursache der Mehrzahl an Zuständen ist die Asymmetrie der Proteine und die uneinheitliche Verteilung der Aminosäuren über die Proteinoberfläche: Für eine gegebene Oberfläche können zwar bestimmte Arten von Aminosäuren (z.B. geladene) bevorzugt adsorbiert werden, es kann aber mehrere Regionen auf einem Protein geben, in denen diese Residuen verstärkt auftreten. Durch die Asymmetrie des Moleküls sind auch hier mehrere Orientierungen auf dem Adsorbens möglich, obgleich es bevorzugte Ausrichtungen geben wird.

4. Eine perfekt homogene Oberfläche als Adsorbens wird schwerlich in irgendeiner Anwendung zu finden sein. So sind eventuell für die Proteine bei Annäherung an die Oberfläche unterschiedlich geartete Bindungsstellen verfügbar, die Ionenbeziehungen, Wasserstoff-Brückenbindungen,

hydrophobe Interaktionen oder andere begünstigen, so daß die Proteine mit unterschiedlichen Residuen binden.

3.1.3 Reversibilität der Adsorption

Prinzipiell ist die Adsorption eines Proteins an eine Oberfläche reversibel. Allerdings ist bei Verdünnung mit dem Adsorptionsmedium im normalen Zeitrahmen eines Experiments (Stunden oder Tage) nur mit einer geringfügigen, wenn überhaupt vorhandenen, Desorption zu rechnen. Das adsorbierte Molekül ist über zahlreiche Segmente an die Oberfläche gebunden, die molare Adsorptionsenergie nimmt dadurch hohe Werte an. Wie beschrieben, kann das Molekül nach seiner Adsorption zusätzlich seine Struktur verändern, was noch zur freien Adsorptionsenergie beiträgt. Der Desorptionsprozeß ist dann nicht eine bloße Umkehrung der Adsorption, sondern es muß die Summe der freien Energien der Adsorption und der Strukturänderung übertroffen werden. Da die Aktivierungsenergie der Adsorption deutlich kleiner ist als die der Desorption, ist der Desorptionsprozeß wesentlich langsamer (Norde, 1986).

Im Gegensatz dazu ist ein Verdrängungsprozeß durch gleich- oder andersartige Moleküle zu beobachten. Hierbei kann es zur schrittweisen Lösung der Bindungsstellen kommen, jeweils zugunsten des neu ankommenden Moleküls, das die freiwerdende Bindungsstelle besetzt. Relevant ist jetzt die Aktivierungsenergie für ein einzelnes zu desorbierendes Segment, wodurch der Verdrängungsprozeß wesentlich schneller ist als die Desorption durch Verdünnung, bei der sich alle Segmente simultan lösen müssen (Norde, 1986; Brash, 1987).

Im allgemeinen ist das Ausmaß des Austausches auf hydrophilen Oberflächen größer als auf hydrophoben (Brash, 1987), hängt allerdings von diversen weiteren Faktoren ab, deren Einfluß größtenteils noch kontrovers diskutiert wird, u.a. Proteinkonzentration in der Lösung und auf der Oberfläche, Bewegung des Adsorptionsmediums und Strukturveränderung der Proteine (Norde, 1986).

3.1.4 Kompetitive Adsorption und Adsorptionskinetik

Die bisher dargestellten Grundlagen beziehen sich zunächst auf die Adsorption eines Proteins. Von breitem Interesse ist darüber hinaus die Konkurrenz in Multikomponenten-Systemen, da die meisten praktisch

relevanten Systeme inklusive der Körperflüssigkeiten eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine enthalten.

Eine zentrale Frage ist dabei, ob die adsorbierten Mengen der Proteine ihre jeweiligen Konzentrationen in den Lösungen widerspiegeln oder ob die Adsorbensoberflächen bestimmte Proteine "auswählen". Bisherige Ergebnisse zeigen im allgemeinen eine deutliche präferentielle Adsorption einiger Proteine. Es kommt zur Anreicherung bestimmter Komponenten auf der Oberfläche und zur Verarmung anderer, jeweils relativ gesehen zur Bulkphase (Horbett und Brash, 1987).

Einflußfaktoren

Bis heute liegen jedoch wenig Erkenntnisse über eventuell vorhandene generelle Mechanismen der Konkurrenzreaktionen vor. Untrennbar damit verbunden ist zumindest die Betrachtung der Adsorptionskinetik, da sich das Spektrum der adsorbierten Proteine mit der Zeit verändern kann. Im folgenden sollen kurz die möglichen Einflußfaktoren angesprochen werden, wobei eine Einteilung nach Affinitäts-Faktoren und kinetischen Faktoren (modifiziert nach Horbett und Brash, 1987) vorgenommen wird:

Elektrische Ladung, Hydrophobie / Hydrophilie und verfügbare chemische funktionelle Gruppen der Proteinoberfläche, die bereits oben beschrieben worden sind, sind Affinitätsfaktoren, da sie selbst die Adsorption direkt beeinflussen. Hierzu gehören des weiteren die Interaktionen innerhalb der adsorbierten Proteinschicht, wobei es im Vergleich zu Lösungen einzelner Proteine, in denen eher abstoßende Kräfte dominieren (z.B. gleichsinnige Ladung), in Multikomponenten-Systemen verstärkt zu Anziehungs-Effekten kommen kann.

Die Stabilität / Fragilität der Proteinkonformation ist in erster Linie zwar ebenfalls ein Affinitätsfaktor, da eine Konformationsänderung mit einhergehendem Entropiegewinn die Adsorption begünstigt. Wie unter 2.1.2 dargelegt, kann sich die Konformation aber auch nach der Adsorption noch ändern, was wiederum die Eigenschaften der bereits adsorbierten Proteinschicht als Funktion der Zeit verändert und somit auch einen kinetischen Faktor darstellt. Gleichfalls in beide Kategorien kann die Molekülgröße eingeordnet werden, da sie sowohl durch die Anzahl an Bindungsstellen die eigentliche Affinität als auch durch ihren Effekt auf die Diffusion die Zeitabhängigkeit (gegensätzlich) beeinflusst.

Essentiell für die Konkurrenz um eine Adsorption ist selbstverständlich die relative Konzentration der Proteine in der Bulkphase. Sie ist als kinetischer Faktor einzustufen, da sie die Ankunftsrate der Proteine an der

Adsorbensoberfläche und damit die Adsorptionsrate beeinflusst. Die Ankunftsrate an der Oberfläche kann ausgedrückt werden durch:

$$\frac{dC_{\text{surf}}^{\text{diff}}}{dt} = C_0 \left(\frac{D}{\pi t} \right)^{1/2}$$

$dC_{\text{surf}}^{\text{diff}}$ = zweidimensionale Bulkkonzentration nahe der Oberfläche

C_0 = Bulkkonzentration, entfernt von der Oberfläche

t = Zeit,

D = Diffusionskoeffizient.

Die Ankunftsrate ist also proportional zur Bulkkonzentration und zur Quadratwurzel des Diffusionskoeffizienten, der mit kleiner werdendem Radius steigt. Die Adsorptionsrate wiederum ist unmittelbar abhängig von der Konzentration nahe der Oberfläche (Horbett und Brash, 1987).

Die aufgezeigten Faktoren sind einzeln betrachtet bereits schwierig gegeneinander abzuwägen. Da sie sich zusätzlich auf vielfältige Weisen gegenseitig beeinflussen können, liegt es auf der Hand, daß eine zuverlässige Vorhersage einer Proteinadsorption aus Multikomponenten-Systemen nach derzeitigem Wissensstand, wenn überhaupt, nur sehr begrenzt möglich ist, zumal bei den anzustellenden Überlegungen das jeweilige Adsorbens ebenfalls berücksichtigt werden muß.

Der einzig sinnvolle Ansatz ist daher die direkte Messung der Adsorption in einem derartigen System selbst. Zunächst können dabei Pufferlösungen weniger Proteine benutzt werden, um Erfahrungen mit der kompetitiven Adsorption zu gewinnen und Prinzipien aufzuzeigen. Es hat sich jedoch gezeigt, daß letztlich der Weg an der direkten Untersuchung der eigentlich interessierenden komplexen Mischungen, sei diese auch komplizierter, nicht vorbeiführt.

Kompetitive Adsorption aus Pufferlösungen

Exemplarisch werden hier die Ergebnisse einiger typischer Studien kurz vorgestellt. Als ein vielfach verwendetes einfaches Modell für die Adsorption aus Plasma dient ein Zwei- oder Drei-Protein-System mit den im Plasma hochkonzentrierten Proteinen Albumin, IgG und Fibrinogen. Mehrere Autoren beobachteten aus binären Mischungen mit Albumin und Fibrinogen auf unterschiedlichen Oberflächen zunächst eine schnelle Adsorption von Albumin, das im folgenden vom Fibrinogen verdrängt wurde

(Cuypers et al., 1977; Lok et al., 1983; Lensen et al., 1984). Abhängig von der Oberfläche wurde aber auch der umgekehrte Fall berichtet (Lee et al., 1974). In ternären Mischungen mit Albumin, IgG und Fibrinogen fanden beispielsweise Kochwa et al. (1977) auf Polyurethan-Oberflächen und Lensen et al. (1984) auf Polystyrol eine deutliche präferentielle Adsorption von Fibrinogen, wohingegen Lee et al. (1974) auf mehreren Polymer-Oberflächen zunächst hohe Globulin- und Fibrinogen-Konzentrationen feststellten, die dann von Albumin verdrängt wurden.

Feststellbar ist also bereits anhand dieser Mischungen das Prinzip der präferentiellen Adsorption in deutlicher Abhängigkeit von der Oberfläche und der Zeit. In diesem Zusammenhang ist darüber hinaus die Beobachtung wichtig, daß eine lineare Variation eines aus Copolymeren bestehenden Adsorbens keineswegs eine lineare Veränderung der Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht nach sich zieht (z.B. Adsorption aus Plasma und aus künstlicher Tränenflüssigkeit (Horbett und Weathersby, 1981; Horbett, 1987)).

Kompetitive Adsorption aus Plasma

Essentiell sind allerdings die Studien mit Plasma selbst. Humanplasma enthält über 200 Proteine (Putnam, 1984a, b; Schwick und Haupt, 1984), von denen die meisten stark oberflächenaktiv sind (Andrade, 1985). Die Vielzahl der möglichen Interaktionen ist evident.

Brash (1987) beschreibt in einer Zusammenfassung seiner Arbeiten zwei prinzipielle Ansätze zur Untersuchung der Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht: Im ersten werden kleine Mengen einzelner Proteine radioaktiv markiert, dem Plasma zugesetzt und ihre Adsorption als Funktion der Zeit, Plasmakonzentration und Adsorbensoberfläche gemessen. Dies ergibt quantitative Resultate für jeweils einzelne Proteine, ist jedoch äußerst aufwendig, um ein Gesamtbild zu erhalten. Außerdem ist es noch immer umstritten, ob die radioaktive Markierung das Adsorptionsverhalten nachhaltig beeinflußt (Lensen et al., 1984 und 1986; Walsh und Gosling, 1986). Der zweite Ansatz ist mehr qualitativer Natur und beabsichtigt, die Vielzahl der Proteine zu identifizieren. Nach Plasmakontakt werden die Partikel von der Oberfläche eluiert und mittels Elektrophorese (SDS-PAGE) oder anderer Techniken analysiert.

Die Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Albumin, IgG und Fibrinogen in Plasma ergaben, daß das Plasma die Adsorption stark modifiziert. Einzelprotein-Lösungen oder einfache Mischungen eignen sich nicht zur Vorhersage der Plasmaadsorption. Beispielsweise wurde Fibrinogen auf vielen Oberflächen gar nicht oder nur vorübergehend

adsorbiert, was im krassen Widerspruch zur Adsorption aus den oben beschriebenen einfachen Mischungen steht. Aus der Beobachtung, daß die besagten Hauptproteine insgesamt nur in geringer Konzentration adsorbieren, bekanntermaßen aber eine kompakte Proteinschicht auf den betreffenden Oberflächen entsteht, drängt sich der Schluß auf, daß die im Plasma geringer konzentrierten Proteine in dieser adsorbierten Schicht eine wichtige Rolle spielen (Uniyal und Brash, 1982).

Vroman et al.(1980) und Vroman und Adams (1986) postulierten aufgrund ihrer Ergebnisse eine rasche Sequenz von Adsorptions- und Verdrängungserscheinungen, im Laufe derer höher konzentrierte Proteine von geringer konzentrierten verdrängt werden. Auf den meisten Oberflächen wurde eine hohe Initialkonzentration von Fibrinogen gefunden, das mit der Zeit durch andere ersetzt wurde ("Vroman-Effekt"). Vroman selbst (Vroman et al., 1980; Schmaier et al., 1984) kam zu der Überzeugung, daß Komponenten des intrinsischen Koagulationssystems, beispielsweise HMWK (High Molecular Weight Kininogen), das Fibrinogen verdrängen, wohingegen Breemhaar et al. (1984) HDL (bzw. die Apolipoproteine der High Density Lipoproteins) als verdrängende Spezies präsentierten.

Neben der bereits festgestellten Zeitabhängigkeit zeigen u.a. Arbeiten von Brash und ten Hove (1984) und Horbett (1987), z. T. zur Untersuchung des Vroman-Effektes, eine deutliche Abhängigkeit der Adsorption einzelner Proteine von der Konzentration (Verdünnung) des Plasmas, wobei das Ausmaß dieser Abhängigkeit zusätzlich von der Adsorbensoberfläche abhängt. Für die Simulation der Adsorption *in vivo* ergibt sich daraus die Forderung nach einer Inkubation in möglichst konzentriertem Plasma.

Weiteren Aufschluß bezüglich der Zusammensetzung der Adsorptionsschicht können Resultate der qualitativen Experimente, beispielsweise SDS-PAGE, geben. Hierbei erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht, es resultiert ein Bandenmuster. Verschiedenste Materialien wurden untersucht, beispielsweise Glas (Brash und Thibodeau, 1986; Mulzer und Brash, 1990), Polystyrol, rein und modifiziert mit funktionellen Gruppen (Boisson-Vidal et al., 1991), Polymere auf Acrylatbasis (Horbett und Weathersby, 1981; Horbett, 1987). Besonderes Interesse fanden arthroplastische Materialien wie Polymethylmethacrylate, Titan, Chrom und Cobalt (Kossovsky et al., 1992) und potentielle Hämodialysemembranen wie Celluloseester, Cuprophan, Polyacrylonitril und Polymethacrylate (Cornelius und Brash, 1993; Parzer et al., 1993). Generell wurden innerhalb der Studien Unterschiede der Adsorptionsmuster gefunden, was die Notwendigkeit ihrer Aufklärung

unterstreicht. Einzelne Proteine konnten, z. B. mit Immunoblotting, identifiziert werden. Viele Proteine, auf die nicht speziell getestet wird, werden mit diesem Verfahren allerdings nicht identifiziert. Der Komplexität des Adsorptionsmusters auf vielen Oberflächen ist mit der SDS-PAGE aufgrund der begrenzten Auflösung kaum Rechnung zu tragen.

Während der Entstehung dieser Arbeit erschien ein interessanter Ansatz von Ho et al. (1991), der die Adsorption auf heparinisierten Oberflächen untersuchte, indem das Plasma vor und nach Inkubation/Adsorption mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt wurde. Von der Verringerung der Konzentration einiger Proteine in der Bulklösung wurde auf deren Adsorption geschlossen. Mit der 2D-Elektrophorese konnte eine Vielzahl von Proteinen nebeneinander detektiert werden. Allerdings ist durch die Messung der Proteinabnahme in der Bulklösung statt der Analytik von der Oberfläche eluierter Proteine nur die Inkubation in sehr verdünntem Plasma möglich (hier 1/30), da in hochkonzentrierten Lösungen die Unterschiede vor und nach Inkubation nicht detektierbar sind.

3.2 Spezielle Oberflächen

Im folgenden sollen für diejenigen Oberflächen, die für diese Arbeit von besonderer Relevanz sind, bestehende Erkenntnisse bezüglich ihrer Proteinadsorption, unter besonderer Berücksichtigung der kompetitiven, zusammengefaßt werden.

3.2.1 Polystyrol

Neben zahllosen Publikationen mit Pufferlösungen einzelner Proteine sind diverse Studien mit Mischungen, meist der Hauptproteine des Plasmas, und deutlich weniger mit Vollplasma verfügbar. Nach der Adsorption aus Mischungen zeigt sich eine starke präferentielle Adsorption von Fibrinogen gegenüber Albumin und IgG (Lensen et al., 1984 und 1986). Bale et al. (1988) geben die relativen Affinitäten für Polystyrol mit Fibrinogen > Fibronectin > Immunglobulin > Albumin an. In verdünntem Plasma mit radioaktiv markierten Proteinen beobachteten Uniyal und Brash (1982) auf Polystyrol als einzigem in einer Reihe unterschiedlichster Oberflächen eine substantielle Adsorption von Fibrinogen, die die von Albumin und IgG deutlich überstieg und auch über mehrere Stunden anhält. Bantjes et al. (1985) detektierten mittels Enzym-Immunoassay ebenso eine präferentielle

Adsorption des Fibrinogens aus Pufferlösungen und verdünntem Plasma, allerdings war in Vollplasma die Fibrinogen-Adsorption deutlich reduziert zugunsten der präferentiellen Adsorption von HDL. Dagegen zeigten Bale et al. (1988) in Vollplasma mit SDS-Elektrophorese eine deutliche Adsorption von Fibrinogen. Boisson-Vidal et al. (1991) wiesen mit der gleichen Technik eine starke Adsorption auf mit funktionellen Gruppen modifiziertem Polystyrol nach, wobei wiederum Fibrinogen in großen Mengen und des weiteren Plasminogen, Transferrin, Albumin und IgG detektiert wurden. Die geringe detektierte Proteinmenge auf Polystyrol selbst wurde auf mangelhafte Elution von der stark hydrophoben Oberfläche zurückgeführt, die Proteine mit Fibrinogen, Albumin und IgG angegeben. Viele Banden blieben jedoch in beiden Studien unidentifiziert.

Die trotz der generellen Übereinstimmungen beobachteten Diskrepanzen sind vermutlich auf unterschiedliche Versuchsvoraussetzungen zurückzuführen. In den meisten Studien wurden Latexpartikel bzw. Röhrensegmente verwendet, wohingegen Bantjes et al. beispielsweise Mikrotiterplatten benutzten. Außerdem konnten Studien mit Pufferlösungen einzelner Proteine Unterschiede in der Adsorption auf Polystyrol-Latexpartikeln mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften nachweisen (z. B. Ladung und Ladungsdichte; Shirahama und Suzawa, 1985; Zsom, 1986; Elgersma et al., 1990 und 1991). In den allerwenigsten kompetitiven Versuchen sind die Polystyrol-Oberflächen näher charakterisiert, so daß eine Vergleichbarkeit erschwert wird.

3.2.2. Polyethylenoxid

Polyethylenoxid-Oberflächen (PEO) haben große Bedeutung erlangt als potentiell Material für viele medizinische und pharmazeutische Anwendungen wie beispielsweise vaskuläre Transplantate, Katheter, Kontaktlinsen, Drug-Delivery-Systeme, Biosensoren und Medien zur Protein- und Zellseparation. Sie können sowohl durch einfache Adsorption oder durch kovalente Bindungen der PEO-Ketten an ein Substrat hergestellt werden. Ebenso ist die Bindung an eine Oberfläche über ein "Backbone"-Polymer möglich oder die Inkorporation als Blocksegment in eine Reihe von Polymeren (Gombotz et al., 1992). Das große Interesse verdankt das PEO besonders seiner allgemein anerkannten niedrigen Proteinadsorption, deren Gründe noch nicht vollständig geklärt sind. Vorgeschlagen wurden u.a. die hohe Beweglichkeit der hydrierten PEO-Ketten, das hohe Ausschlußvolumen des PEO-Moleküls, eine abstoßende Kraft resultierend

aus einem drohenden Entropieverlust des gefalteten PEO-Moleküls, die geringe freie Grenzflächenenergie an der Grenzfläche PEO/Wasser, das Fehlen ionischer und hydrophober Bindungsstellen (Gombotz et al., 1992) und eine sterische Abstoßung der Proteine (Jeon et al., 1991). Im folgenden werden bisher durchgeführte Studien aufgeführt. Die möglicherweise zugrunde liegenden Prinzipien der Proteinresistenz, beispielsweise unter besonderer Berücksichtigung der theoretischen Überlegungen von Jeon et al. (1991) und Jeon und Andrade (1991), werden detaillierter im Zusammenhang mit den Resultaten im experimentellen Teil diskutiert.

Diverse Studien mit Pufferlösungen einzelner Proteine (Fibrinogen, Albumin bzw. IgG) konnten das die Proteinadsorption reduzierende Potential des PEO demonstrieren, meist im Vergleich mit Oberflächen, an die die PEO-Ketten auf unterschiedliche Weisen gebunden wurden (Lee, J.H. et al., 1989 und 1990; Stenius et al., 1990; Bergström et al., 1992; Amiji und Park, 1992; Hu et al., 1993).

Gombotz et al. (1991) und Desai und Hubbell (1991) zeigten die Abhängigkeit der Proteinadsorption von der PEO-Kettenlänge auf, wobei für ähnliche Systeme (PEO auf Polyethylen-Terephthalat (PET)) unterschiedliche Kettenlängen für eine effektive Reduktion der Adsorption gefunden wurden. In einer weiteren Publikation wurde erneut die sinkende Adsorption bei steigender PEO-Kettenlänge deutlich (Gombotz et al., 1992), wobei das als einziges vermessene Fibrinogen aus Plasma wesentlich geringer adsorbierte als aus Pufferlösungen. Diese Beobachtung machten auch Grainger et al. (1989), die die Proteinadsorption auf Multiblock-Copolymeren aus Polystyrol und PEO untersuchten. Die Resultate der kompetitiven Adsorption der radioaktiv markierten Albumin, Fibrinogen und IgG aus Mischungen in Puffer und aus Plasma zeigten große Unterschiede. Die aus Plasma adsorbierten relativen Mengen können mit $\text{Albumin} = \text{IgG} > \text{Fibrinogen}$ wiedergegeben werden, die absoluten Mengen waren deutlich niedriger als aus Pufferlösungen. Dies läßt auf eine starke Konkurrenz der übrigen Plasmakomponenten schließen und verdeutlicht die Notwendigkeit der qualitativen Analytik der adsorbierten Proteinschicht.

Potentielle Arzneistoffträger

An dieser Stelle sollen kurz die Studien angesprochen werden, die eine Proteinadsorption auf mit Block-Copolymeren modifizierten Polystyrol-Nanopartikeln untersuchten, wie sie auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Die Copolymere aus den Reihen der Poloxamere und Poloxamine bestehen aus einem hydrophoberen Mittelteil (Polypropylenoxid, PPO), mit dem sie

hauptsächlich auf dem Polystyrol adsorbieren, und hydrophileren PEO-Seitenketten.

Lee, J. et al. (1989) und Tan und Martic (1990) beschrieben eine starke Reduktion der Proteinadsorption durch den Copolymer-Überzug, für mit langkettigen Block-Copolymeren überzogene Partikel sogar eine nicht detektierbare bzw. "zu vernachlässigende" Adsorption. Dies galt sowohl für Albumin- und Fibrinogen-Lösungen als auch für Vollplasma. Als Analyseverfahren diente vor allem die Photonenkorrelationsspektroskopie, mit der nach Proteinadsorption eine Zunahme des Partikeldurchmessers ermittelt wurde. Ebenfalls nur eine grobe Abschätzung der Adsorption ist durch die Vermessung der Partikel mittels Laser-Doppler-Anemometrie in Serum möglich, bei der das Zetapotential ein Maß für die adsorbierte Proteinmenge ist. Hiermit wurde ebenso eine abnehmende Adsorption mit zunehmendem Molekulargewicht der Copolymere detektiert (Blunk und Müller, 1989).

O'Mullane et al. (1988) zeigten gegenüber reinen Polystyrol-Partikeln durch Überzug mit einem hochmolekularen Poloxamer eine drastische Reduktion der Adsorption von radioaktiv markiertem Fibrinogen, sowohl aus Pufferlösung als auch aus Plasma. Durch den Vergleich mehrerer Block-Copolymere führten Norman et al. (1992) die wachsende Reduktion der Proteinadsorption auf zunehmende PEO-Kettenlänge zurück. Detektiert wurde hier die Adsorption von Albumin aus Pufferlösung, sowohl mittels radioaktiver Markierung als auch densitometrisch auf SDS-Polyacrylamidgelen.

Die in diesem Zusammenhang einzige Studie, die eine kompetitive Proteinadsorption aus Plasma beschreibt, stammt ebenfalls von Norman et al. (1993a) und bediente sich der SDS-Elektrophorese mit anschließendem Immunoblotting. Sowohl in Plasmakonzentrationen von 0,3 % (V/V) als auch von 50 % (V/V) (leider die höchste Konzentration der Studie) wurde die absolute adsorbierte Proteinmenge korreliert mit der PEO-Kettenlänge der verschiedenen Block-Copolymere, eine längere PEO-Kette führte zu einer reduzierten Adsorption. Nach Adsorption aus 50prozentigem Plasma wurden neun Banden beschrieben, wobei keine qualitativen Unterschiede zwischen den reinen Polystyrol-Partikeln und vier Partikeln mit unterschiedlichen Polymer-Überzügen detektiert wurden, für einzelne Banden allerdings deutliche Reduktionen durch die Überzüge gegenüber den unmodifizierten Partikeln zu verzeichnen waren. Durch Immunoblotting wurden IgG, Fibrinogen, Transferrin, Komplement C3 und Fibronectin nachgewiesen.

In einem *In-vivo*-Modell am Kaninchen zeigten Norman et al. (1993b) die Proteinadsorption aus Peritonealflüssigkeit auf den gleichen Partikeln. Mit SDS-Elektrophorese wurden sechs Banden detektiert, die allerdings unidentifiziert blieben.

Insgesamt gesehen wird das Bestreben deutlich, sich die Eigenschaften des PEO für eine reduzierte Proteinadsorption zunutze zu machen. Auf dieses Ziel hin waren auch die meisten Untersuchungen aufgebaut. Es fällt auf, daß wenige Erkenntnisse über die qualitative Zusammensetzung der Proteinschicht nach kompetitiver Adsorption aus Plasma vorliegen. Da aber gerade diesem Aspekt eine Schlüsselrolle bezüglich der Biokompatibilität der zu untersuchenden Materialien zugeschrieben wird, erscheint die detaillierte Aufklärung der Adsorptionsmuster überfällig und unabdingbar. An diesem Punkt setzt diese Arbeit an.

Experimenteller Teil - Material und Methoden

4 Verwendete potentielle Arzneistoffträger

4.1 Nanopartikel

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Polystyrol-Latexpartikel als Modellarzneistoffträger aus folgenden Überlegungen heraus eingesetzt:

- Es handelt sich um klar definierte und bereits ausgiebig charakterisierte Partikel. Dies ist für die Etablierung der neuartigen Methode zur Untersuchung der Proteinadsorption zunächst weit wichtiger als eine eventuelle therapeutische Relevanz.
- Es können beliebige Größen hergestellt und die Oberflächen durch die Adsorption von Tensiden auf einfache Art modifiziert werden (Müller, 1991). Dies bietet eine große Variationsbreite zum Studium von Oberflächeneinflüssen.
- Die Dispersionen sind in hoher Konzentration herstellbar, so daß sich eine große Oberfläche bei kleinem Probenvolumen ergibt. Dies ist wichtig, um eine ausreichende Menge adsorbierter Proteine für die Analytik zu erhalten, ohne das Inkubationsmedium (Plasma) durch den Zusatz der Partikelsuspension zu stark verdünnen zu müssen.
- Es sind größere Volumina derselben Charge erhältlich. Streuungen der Versuchsergebnisse aufgrund geringfügiger Änderung der Oberflächeneigenschaften bei Chargenwechsel sind so auszuschließen.
- Die Suspensionen sind quasi monodispers, so daß auch hierdurch Streuungen der Ergebnisse minimiert werden.
- Durch die Dichte von 1050 kg/m^3 ist eine Abtrennung der Partikel von Plasma ($\sim 1030 \text{ kg/m}^3$) und Wasser möglich.
- Die Partikel liegen vor Inkubation im Plasma bereits suspendiert in Wasser vor, müssen also nicht mehr benetzt werden.
- Für mit Tensiden modifizierte Polystyrol-Partikel liegen Ergebnisse aus *In-vivo*-Untersuchungen vor (Illum et al., 1987; Illum und Davis, 1987; Müller, 1991), mit denen die hier gefundenen Ergebnisse zur Proteinadsorption in Zusammenhang gebracht werden sollen, um erste Hinweise auf eine Korrelation von adsorbierten Proteinen und Organverteilung geben zu können.

Es wurden mehrere Chargen tensidfreier Polystyrol-Latexpartikel der Firma Polysciences (Eppelheim) mit folgenden Durchmessern verwendet: 63 ± 1 nm, 480 ± 10 nm, und 997 ± 19 nm. Außerdem stand eine Charge ebenfalls tensidfreier Polystyrol-Partikel mit einem Durchmesser von $199,1 \pm 0,8$ nm zur Verfügung. Bei diesen handelte es sich um die von Wesemeyer (1993) verwendeten Partikel, so daß die dort erzielten Ergebnisse bezüglich der Oberflächenhydrophobie in die Diskussion der hier vorgelegten Ergebnisse einfließen können. Die verwendeten 63 nm Partikel entsprachen bezüglich ihrer physikochemischen Charakterisierung denen aus den *In-vivo*-Studien von Illum et al. (1987) und Illum und Davis (1987). Im folgenden werden die Polystyrol-Partikel auch mit PS 60, PS 200, PS 480 und PS 1000 abgekürzt.

Die Oberflächen der Polystyrol-Partikel wurden durch Adsorption von Block-Copolymeren aus den Reihen der Poloxamere und Poloxamine modifiziert (hydrophobe Wechselwirkungen, Entropiegewinn des Wassers; Müller, 1991; Wesemeyer, 1993). Verwendet wurden die Poloxamere 184, 188, 235, 237, 238, 338 und 407 und Poloxamine 908 (ICI, Middlesborough, GB).

Partikelsuspensionen und Tensidlösungen wurden im Volumenverhältnis 1:4 zusammengegeben und 24 h bei 25°C äquilibriert. Die Konzentration der Polysciences-Partikel betrug 2,5 % (m/V), die der PS 200 5 % (m/m) und die der Tensidlösungen 2,5 % (m/m). Überschüssiges Tensid wurde durch mehrfaches Zentrifugieren und Waschen mit destilliertem Wasser entfernt (Wesemeyer, 1993).

Die Dicke der adsorbierten Tensidschicht wurde durch Messung des hydrodynamischen Radius (PCS, Kapitel 4.1) vor und nach Adsorption bestimmt. Obwohl die Messung in verdünnten Dispersionen vorgenommen werden muß, kommt es dabei nicht zu einer Desorption des Tensids (Wallis und Müller, 1990).

Wenn nicht anders vermerkt, wurde zur Inkubation der Partikel im Plasma eine 2,5prozentige Partikelsuspension verwendet.

4.2 Parenterale Fettemulsionen

Neben den Nanopartikeln wurde die Analytik der Proteinadsorption mit 2D-PAGE einer weiteren Arzneiform, den parenteralen Fettemulsionen, zugänglich gemacht. Es wurden 20prozentige Sojaöl-Emulsionen hergestellt, die als Emulgatoren die gleichen Block-Copolymere (Poloxamere und

Poloxamine) enthielten, die auch zur Nanopartikelmodifikation verwendet wurden. So konnte der Effekt gleicher Tenside auf die Proteinadsorption auf unterschiedlichen partikulären Trägern untersucht werden.

4.2.1 Herstellung

4.2.1.1 Hochdruckhomogenisation

Die Emulsionsherstellung mittels Hochdruckhomogenisation basiert auf der Kavitation. Hierbei sinkt der Druck in einer Flüssigkeit beim Durchtritt durch eine Düse infolge hoher Geschwindigkeiten partiell unter das Verdampfungs-niveau. Die dadurch gebildeten Dampfblasen implodieren bei wieder ansteigendem Druck aufgrund fallender Geschwindigkeit. Die freiwerdende Stoßwelle und insbesondere die energiereichen Wasserstrahlen, die bei der Implosion durch die Blasen schießen können, werden für die Zerteilungsvorgänge bei der Emulsionsbildung verantwortlich gemacht. Weiterführende Erläuterungen zur Hochdruckhomogenisation finden sich beispielsweise bei Lucks (1993) und Bock (1994).

Vor der Hochdruckhomogenisation wurde eine Voremulsion mit einem Ultra-Turrax T25 (Janke und Kunkel, Staufen) hergestellt. Anschließend wurden die Emulsionen mit einem Micronlab 40 (APV Gaulin, Lübeck) hochdruckhomogenisiert. Die Herstellungsprinzipien wurden bereits von Bock (1994) ausführlich dargestellt.

4.2.1.2 Rezepturen

Die Block-Copolymer-Emulsionen enthielten 20 % Sojaöl, 2,5 % Poloxamer bzw. Poloxamine und bidestilliertes Wasser. Die mittleren Teilchendurchmesser lagen zwischen 340 und 400 nm (PCS), der maximale Teilchendurchmesser war in den meisten Fällen kleiner als 1,8 μm , in zwei Ausnahmen kleiner als 3,6 μm (Laserdiffraktometer, s. Kap. 10). Alle Formulierungen entsprachen hinsichtlich der Teilchengrößen den Ansprüchen an eine parenteral applizierbare Emulsion.

4.3 Teilchengrößenanalytik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verwendeten Arzneistoffträger hinsichtlich ihrer Teilchengröße (PCS), Teilchengrößenverteilung bzw. der Größe ihrer Oberfläche (LD) charakterisiert. Beides sind in der Arbeitsgruppe bereits hinlänglich etablierte Verfahren, so daß sie daher nur in Kürze dargelegt werden und auf weiterführende Literatur verwiesen wird.

4.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist ein Laserstreulichtverfahren, das Teilchen im Größenbereich von 5 nm bis 3 µm erfaßt.

Es wurde eingesetzt zur Bestimmung

- des hydrodynamischen Radius der Nanopartikel und der Emulsionströpfchen,
- der Polydispersität dieser Systeme und
- der Dicke einer adsorbierten Block-Copolymerschicht auf den Nanopartikeln.

4.3.1.1 Grundlagen

Ausführliche Erläuterungen des Verfahrens geben bereits Müller und Müller (1983) und Diederichs (1993). Der optische Aufbau der Anlage ist in Abb. 4.3 /1 (nach Bunville et al., 1984) dargestellt.

Grundlage des Meßverfahrens ist die Streuung von Laserlicht, das in eine Partikelsuspension eingestrahlt wird. In der Probenzelle kommt es aufgrund der Brownschen Molekularbewegung des Wassers zu einer Diffusion suspendierter Teilchen. Mit einem Photomultiplier wird in vorgegebenen Zeitabständen (Taktzeit τ) die Schwankung der Streulichtintensität gemessen, aus der eine Korrelationsfunktion $g(\tau)$ berechnet wird:

$$g(\tau) = 1 + e^{-2DKs^2\tau}$$

τ = Taktzeit

D = Diffusionskoeffizient der Partikel

Ks = Betrag des Streulichtvektors.

Es gilt:

$$K_s = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\Theta_s}{2}\right)$$

n = Brechungsindex des Dispersionsmediums

λ = Wellenlänge des Laserlichtes

Θ_s = Winkel, in dem das Streulicht aufgefangen wird.

Nach der Stokes-Einstein-Gleichung ergibt sich aus dem Diffusionskoeffizienten D der mittlere hydrodynamische Radius der Partikel.

$$D = \frac{kT}{6\pi r \eta}$$

k = Boltzmann-Konstante

T = Temperatur

r = hydrodynamischer Radius der Teilchen

η = Viskosität des Dispersionsmediums

Demzufolge ist der Verlauf der Korrelationsfunktion von der Partikelgröße abhängig. Die Diffusionsgeschwindigkeit und damit auch die Schwankung der Streulichtintensität nimmt mit abnehmender Teilchengröße zu.

In der oben dargestellten Form gilt die Korrelationsfunktion für ideal monodisperse Systeme. Für polydisperse Systeme sind Abweichungen von dieser Funktion zu verzeichnen, aus denen der Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung berechnet wird. Der PI für monodisperse Teilchen hat den Wert 0, bei zunehmend breiter Teilchengrößenverteilung steigt der PI an, wobei ab einem Wert von 0,5 keine Korrelation mehr zwischen PI und der Breite der Verteilung gegeben ist.

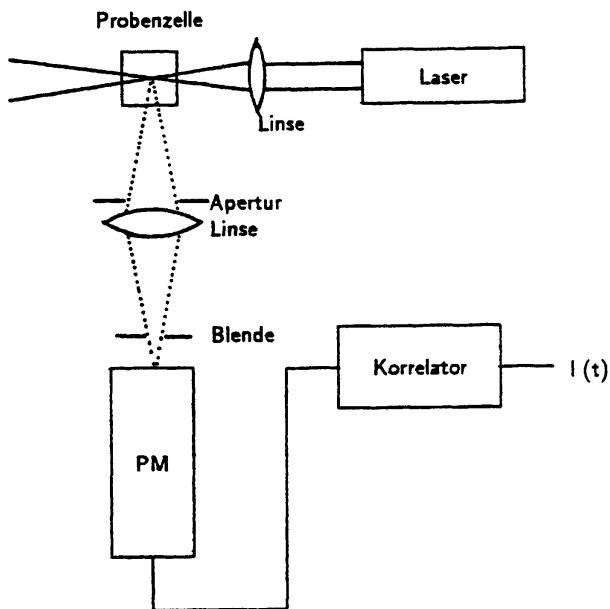


Abb. 4.3 /1: Optischer Aufbau der Photonenkorrelationsspektroskopie.

4.3.1.2 Apparatur und Durchführung

Die verwendete PCS-Anlage bestand aus einem 20 mV Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge 632,8 nm (Typ LGK 7626, Siemens, München), einem Malvern-Spektrometer RR102 (Malvern Instruments, Malvern, UK), einem 1024-Kanal-Korrelator (Digital Strukturator/Correlator ALV 3000, ALV-Laservertriebsgesellschaft, Langen) und einem KWS 68020 Computersystem (KWS-Computersystem GmbH, Ettlingen). Das Streulicht wurde im 90°-Winkel detektiert.

Konzentrierte Partikelsuspensionen bzw. Emulsionen wurden mit frisch destilliertem Wasser verdünnt. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 25°C. Die angegebenen Radien sind Mittelwerte aus 10 Einzelmessungen, die Variationskoeffizienten waren stets kleiner als 1,5 %.

4.3.2 Laserdiffraktometrie (LD)

Die Laserdiffraktometrie ist ebenfalls ein Verfahren zur Partikelgrößenanalytik, und zwar auf der Basis der Beugung von Laserlicht (Fraunhofer-Beugung).

Sie wurde eingesetzt zur Ermittlung

- der Teilchengrößenverteilungen der Emulsionen und
- der volumenbezogenen Oberflächen der Emulsionen.

4.3.2.1 Grundlagen

Der optische Aufbau des Laserdiffraktometers ist in Abb. 4.3 /2 (nach Weiner, 1984) dargestellt. Gleichgroße Partikel erzeugen durch ihre Bewegung im Probenvolumen in der Brennebene der nachgeschalteten Linse ein radialsymmetrisches Beugungsbild, welches aus einem sehr hellen zentralen Kreis besteht, der von konzentrischen dunklen und hellen Ringen umgeben ist. Die Intensitätsverteilung läßt sich folgendermaßen beschreiben (Weiner, 1984):

$$I = I_0 \left(\frac{2J_1(\chi)}{\chi} \right)^2$$

I_0 = Intensität des einfallenden Lichtstrahls

J_1 = Besselfunktion erster Art und erster Ordnung

χ = Radius des dem hellen Zentrum benachbarten, ersten dunklen Ringes.

Nach der Beugungstheorie beugen kleine Partikel das Licht stärker als große. Es gilt:

$$\chi = \left(\frac{2\pi r s}{\lambda F} \right)$$

r = Partikelradius

s = radiale Distanz von der optischen Achse

λ = Wellenlänge der Lichtquelle

F = Brennweite der verwendeten Linse

Bei der Vermessung polydisperser Proben überlagern sich die Beugungsbilder der einzelnen Durchmesser, und es entsteht ein radialsymmetrisches, diffuses Beugungsbild. Die Intensität des Streulichts wird mit Hilfe eines Detektors mit 32 Ringen gemessen. Mittels numerischer Verfahren können aus der Lichtenergie pro Ring und der Verteilungsfunktion der Lichtenergie über die gesamte Detektorfläche Partikelgrößenverteilungen berechnet werden, wobei die Partikel in Klassen gemäß der Ringe des Detektors eingeteilt werden.

Bei der Verarbeitung der gewonnenen Daten ist teilchengrößenabhängig darauf zu achten, ob nach der Fraunhofer- oder nach der Mie-Theorie gearbeitet werden muß, wobei hier auf Weiner (1984) und Lucks (1993) verwiesen werden soll. Weiterhin ist bei Betrachtung der Daten die Präsentation als Volumen- oder Anzahlverteilung zu berücksichtigen.

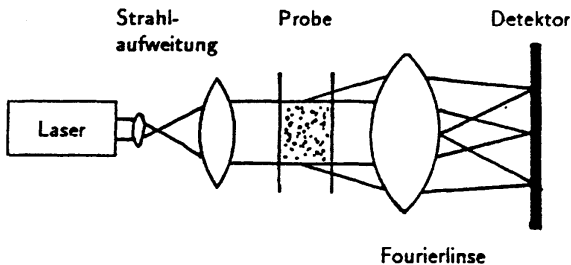


Abb. 4.3 /2: Optische Anordnung zur Erzeugung von Beugungsspektren.

4.3.2.2 Apparatur und Durchführung

Es wurde ein Sympatec HELOS-Laserdiffraktometer benutzt, das mit einem Helium-Neon-Laser (5 mW, Wellenlänge 632,8 nm) ausgestattet war. Für die Messungen wurde eine Fourier-Linse der Brennweite 20 mm verwendet (Meßbereich 0,1 - 35 μm), die Auswertung geschah mit einem Computer Ismatec JPS 12.

Die verwendeten Fetteulsionen wurden vor der Messung mit frisch destilliertem Wasser verdünnt, die Meßdauer betrug 10 s.

Die hier erzielten Ergebnisse werden als Volumenverteilung ohne Mie-Korrektur vorgestellt, wobei folgende Parameter Anwendung finden:

- D_{\max} = Obergrenze der Klasse, in der noch Partikel detektiert werden konnten.
- $D(99\%)$ = 99 % des Gesamtvolumens aller detektierten Partikel ist in Partikeln zu finden, deren Durchmesser kleiner als der angegebene ist.
- $D(50\%)$ = entsprechend $D(99\%)$.
- O_v = volumenbezogene Oberfläche der Emulsion in m^2 pro cm^3 disperser Phase.

Die ermittelten Durchmesser dienen zur Charakterisierung bzw. qualitativen Beurteilung der Emulsion bezüglich ihrer Teilchengrößenverteilung. Der $D(50\%)$ reagiert auf Anwesenheit kleiner Mengen größerer Partikel relativ robust, während der $D(99\%)$ hierauf sehr sensitiv reagiert, was beispielsweise zur Detektion beginnender Koaleszenz ausgenutzt werden kann.

Die Veränderung der volumenbezogenen Oberfläche wurde als Maß für die Stabilität von Fettemulsionen während des Separationsprozesses vom Plasma (s. Kap. 10) verwendet.

5 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Die 2D-PAGE ist ein hochauflösendes Verfahren u.a. zur Proteinauftrennung und wurde verwendet zur qualitativen und semi-quantitativen Aufklärung der Plasmaproteinmuster auf potentiellen Arzneistoffträgern nach Inkubation in Plasma.

1975 beschrieb O'Farrel eine 2D-PAGE zur Optimierung der Auflösung für die Auftrennung der Proteine von *Escherichia coli* (O'Farrel, 1975), die der Analytik zum Durchbruch verhalf und vielfach als Ursprung angesehen wird, von dem aus die Weiterentwicklung der 2D-PAGE-Methodik betrieben wurde. Der Kerngedanke zur Erhöhung der Auflösung ist dabei die zweidimensionale Auftrennung nach zwei völlig unabhängigen Parametern, so daß die Proteine über die gesamte Fläche einer Gelplatte verteilt sind, anstatt sich auf einer Diagonalen anzuordnen. In der ersten Dimension werden die Proteine mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF) allein nach ihrer Ladung (isoelektrischer Punkt) und in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE ausschließlich nach ihrer Größe (Molekulargewicht) aufgetrennt.

5.1 Probenvorbereitung

Bevor die eigentliche 2D-PAGE eingehend beschrieben wird, sollen Überlegungen zur Probenvorbereitung dargelegt und die Gewinnung der Proben näher besprochen werden.

5.1.1 Inkubation und Proteinadsorption

Die zu untersuchenden Arzneistoffträger sollten in einer Proteinlösung inkubiert werden, aus der heraus die Proteine auf den Partikeln adsorbieren. Durch die in der Literatur vorliegenden Adsorptionsstudien war ersichtlich, daß die Adsorption eines bestimmten Proteins sich deutlich verändert in Abhängigkeit vom Medium, in dem es vorher gelöst war (siehe Kapitel 3.2). Dabei spielt insbesondere die Konkurrenzreaktion mit anderen Proteinen eine große Rolle. Statt aus Vereinfachungsgründen zunächst Puffer zu verwenden, die nur wenige Proteine (meist die im Plasma hochkonzentrierten) enthalten, wurde daher von vornherein das Arbeiten mit

Vollplasma angestrebt, um den *In-vivo*-Verhältnissen Rechnung zu tragen. Nur so konnte gewährleistet werden, daß auch im Plasma nur gering konzentrierte Proteine, die aber im Adsorptionsprozeß große Bedeutung erlangen können, zur Analytik gelangten. Die Vielzahl der im Plasma vorliegenden Proteine ist mit der 2D-PAGE als einziger Methode hochsensitiv zu erfassen.

Da sich die vorliegende Arbeit auf die Proteinadsorption konzentrierte, wurde bisher davon abgesehen, die Methode auch auf Vollblut zu übertragen. Dies ist für einen späteren Zeitpunkt vorgesehen, um einen möglichen Einfluß der Blutzellen auf die Interaktion der Proteine mit den Oberflächen der Partikel zu untersuchen.

Für fast alle Untersuchungen wurde Humanplasma eingesetzt. Ein großer Vorteil ist dabei die Existenz von umfangreichen Datenbanken (Verwendung fand hier Swiss-2D-PAGE; Appel et al., 1993), in denen neben der Charakterisierung der Proteine auch die genaue Position auf 2D-Gelen verzeichnet ist, was die Identifizierung auf den vorliegenden Gelen ermöglichte. Für die Übertragung der Proteindetektion mit 2D-PAGE von bereits vorhandenen Anwendungen (z. B. klinische Diagnostik) auf die Proteinadsorption erschien das Humanplasma somit am besten geeignet, nicht zuletzt auch mit Blick auf die letztendlich angestrebte Anwendung der Arzneistoffträger am Menschen.

Zusätzlich wurden die Arzneistoffträger, die im *In-vivo*-Versuch (Kaninchen-Modell) die interessantesten Ergebnisse geliefert hatten, auch in Kaninchen-Serum getestet, um Hinweise zu bekommen, ob die Proteinadsorption aus Humanplasma auf die Spezies des Tiermodells übertragbar ist (9.3.4).

Für die Etablierung der Methode (Kapitel 6) und die routinemäßige Untersuchung der Arzneistoffträger wurde eine Inkubationszeit von 5 min gewählt, da *in vivo* in diesem Zeitrahmen bereits die Elimination durch das MPS (Leber und Milz) erfolgt, was bedeutet, daß die Partikel zu diesem Zeitpunkt bereits das für eine Elimination verantwortliche Proteinmuster adsorbiert haben. In der Literatur finden sich diverse Studien, die die Zeitabhängigkeit der Proteinadsorption auf Oberflächen beschreiben (3.1.4). Um mögliche Veränderungen der Proteinzusammensetzung auf der Oberfläche zu detektieren, die ebenfalls für ein bestimmtes *In-vivo*-Verhalten verantwortlich sein können, wurde die Adsorption in Abhängigkeit von der Zeit an ausgewählten Beispielen getestet (Kapitel 8, 9.3.2). Alle Partikelproben wurden routinemäßig bei 37°C inkubiert.

Der Einfluß der Verwendung von frischem bzw. gefrorenem Plasma, unterschiedlicher Spender und der Plasmakonzentration wurde eingehend untersucht (6.4).

5.1.2 Separation: Zentrifugation und Filtration

Nach vollzogener Adsorption der Proteine des Plasmas an den Partikeln galt es, die Partikel wieder vom Plasma zu trennen. Dies geschah routinemäßig durch Zentrifugation, wobei sich Geschwindigkeit und Dauer nach Art der Partikel richtete. Daß durch diese Behandlung keine ursprünglich adsorbierten Proteine abgeschert wurden, mußte erst noch gezeigt werden (6.3.1). Der Überstand wurde verworfen, die Partikel in destilliertem Wasser redispergiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschprozeß wurde bis zu fünf Mal durchgeführt, um überschüssiges Plasma vollständig zu entfernen.

Als Alternative zur Zentrifugation wurden die Proben filtriert und die Partikel als Filtrerrückstand ausgiebig auf dem Filter gewaschen. Einerseits ermöglichte der Vergleich der Ergebnisse nach Zentrifugation und Filtration Rückschlüsse bezüglich theoretisch denkbarer Proteindesorption während des Separationsprozesses (6.3.2), andererseits wurde durch die Möglichkeit der Filtration unmittelbar nach Inkubationsbeginn die Proteinadsorption in den ersten Sekunden detektierbar (Kapitel 8). Dies wurde sonst durch den weiterbestehenden Kontakt mit dem Plasma während der Zentrifugation verhindert.

Neben Wasser wurden noch mehrere an die physiologischen Verhältnisse angelehnte Puffer als Waschflüssigkeiten getestet (Kapitel 6.3.3).

5.1.3 Desorption und Vorbereitung für die IEF

Nach Abschluß der Waschvorgänge mußten die Proteine von der Oberfläche der Partikel desorbiert werden. Dabei sollten sowohl die hierfür verwendeten Substanzen die Desorption ermöglichen als auch die resultierenden Lösungen mit der anschließenden Isoelektrischen Fokussierung (IEF) kompatibel sein.

Besondere Bedeutung kommt hierbei dem Natrium-Laurylsulfat (SDS) zu: In Verbindung mit reduzierenden Substanzen wie 2-Mercaptoethanol ist eine effektive Proteindesorption mit SDS beschrieben worden (Cook und Retzinger, 1992). Auch in der Vorbereitung von 2D-PAGE-Proben vor Applikation auf die IEF findet SDS eine breite Anwendung, da es die

Löslichkeit und den Eintritt der Proteine ins Gel verbessert (O'Farrel, 1975; Dunn und Burghes, 1983a). Für die 2D-PAGE ist eine vollständige Zerstörung aller Proteinkomplexe und Aggregate in eine Lösung einzelner Polypeptide anzustreben, da ein Protein sonst gleichzeitig im aggregierten Zustand und als Polypeptid auftritt. Dies würde wiederum zum Erscheinen von "Artefakten" in Form der Spots der Aggregate führen. Daher werden auch hier typischerweise zusätzlich zum SDS denaturierende Substanzen zugesetzt, die eine Spaltung von S-S-Bindungen ermöglichen. Durch die Behandlung mit derartigen Kombinationen entstehen Spaltprodukte der ursprünglichen Proteine, wie beispielsweise die α -, β - und γ -Ketten des Fibrinogens, die für die 2D-PAGE typischen getrennt auftretenden Spotgruppen ergeben. Als denaturierende Substanz ist 2-Mercaptoethanol zwar gebräuchlich, führt aber bei kathodischer Applikation zu einer starken Störung des pH-Gradienten in der alkalischen Region. Als Alternativen wurden Dithiothreitol (DTT) und Dithioerythritol (DTE) empfohlen (Righetti et al., 1982; Hochstrasser, D.F. et al., 1988b).

Die mit der IEF kompatible SDS-Konzentration ist allerdings gering, da es sonst zu Verlusten im basischen Bereich des Gels kommt und verstärkt horizontale Streifenbildung auftritt (Dunn und Burghes, 1983a). Daher werden die Proteine günstigerweise erst mit einer höheren SDS-Konzentration gelöst, was in diesem Fall auch die Desorption von den Partikeln gewährleistet. Es folgt eine Verdünnung in Lösungen, die beispielsweise Harnstoff und weitere Tenside enthalten. Daß die Proteine in der IEF tatsächlich nach ihrer ursprünglichen Ladung aufgetrennt werden, ist darin begründet, daß SDS Mischmizellen mit den anderen Tensiden bildet, beispielsweise mit dem Nonidet P-40 (nichtionisches Tensid) der IEF-Gele, und so von den Proteinen entfernt wird (Dunn und Burghes, 1983a).

In der vorliegenden Arbeit wurden, wie bereits in ersten 2D-PAGE-Studien zur Proteinadsorption auf Nanopartikeln (Blunk et al., 1993), die Substanzen für die Probenvorbereitung nach Hochstrasser, D.F. et al. (1988a) verwendet. Dabei wurde zunächst eine hochkonzentrierte SDS-Lösung mit DTE den Partikeln zugesetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Nach kurzer Abkühlung folgte dann Verdünnung mit einer Lösung aus Harnstoff, CHAPS (zwitterionisches Tensid), DTE und Ampholyten (genaue Zusammensetzungen s. Anhang). Die damit erreichte Proteindesorption lag über 90 %, was mit Hilfe des BCA-Protein-Assays (Pierce, Rockford, USA) (Smith et al., 1985) nachgewiesen wurde.

5.1.4 Material

Es wurde Citratplasma einzelner gesunder Probanden verwendet, entnommen in der Blutspendezentrale, Universitätsklinik Kiel. Das eingesetzte Kaninchenserum (R4505) wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Inkubation und die anschließende Zentrifugation fand in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen "Safe Lock" (Eppendorf, Hamburg) statt.

Als Zentrifugen dienten die Biofuge 17 RS und die Megafuge 1.0 R (Heraeus Sepatech, Osterode) mit einem Winkelrotor für Mikroreaktionsgefäße 1379 und einem Winkelrotor 8570. Die als Alternative durchgeführten Filtrationsversuche wurden mit Membranfiltern aus Polycarbonat (Isopore; Millipore, Eschborn) und Celluloseacetat (Sartorius, Göttingen) unternommen. Die verwendeten Chemikalien und Lösungen finden sich im Anhang.

5.1.5 Durchführung: Kurzübersicht des Standardprotokolls

1. Mischen der Partikelsuspension mit Humanplasma im Eppendorf-Reaktionsgefäß,
Inkubation 5 min im Wasserbad bei 37°C.
2. Zentrifugation 60 min bei 15000g.
3. Verwerfen des Überstandes (abpipettieren mit Eppendorf-Pipetten),
Redispergierung des Partikelpellets mit destilliertem Wasser.
4. Viermalige Wiederholung der Schritte 2. und 3..
5. Nach letztmaligem Abpipettieren des Überstandes Redispergierung der
Partikel in Lösung mit SDS und DTE, Inkubation 5 min bei 95°C.
6. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur Zugabe der Lösung mit Harnstoff,
CHAPS, DTE und Ampholyten.
7. Weiterbearbeitung wie normale 2D-PAGE-Plasmaproben.

5.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

5.2.1 Grundlagen

Mit der isoelektrischen Fokussierung können amphotere Moleküle getrennt werden, d.h. sie müssen positiv und negativ geladen sein können und somit einen isoelektrischen Punkt (pI) besitzen, an dem die Nettoladung 0 ist. Die Abhängigkeit der Nettoladung eines bestimmten Proteins vom pH-Wert der

Umgebung wird bestimmt durch die Seitengruppen des Proteins: Carboxyl-Gruppen können je nach pH-Wert neutral oder negativ geladen vorliegen, Amino-, Imidazol- und Guanidin-Gruppen sind entweder positiv geladen oder neutral. Bei dieser Betrachtung muß allerdings auch die dreidimensionale Konfiguration des Proteins beachtet werden (Westermeier, 1990).

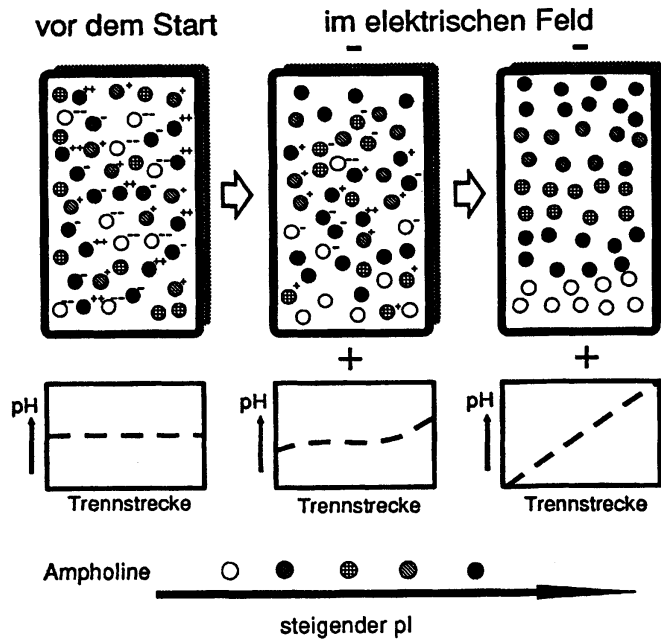


Abb. 5.2 / 1 Entstehung eines pH-Gradienten mittels Trägerampholyten (nach Westermeier, 1990).

Die IEF stellt eine Endpunktmethode dar, d. h. die Trennung ist abgeschlossen, wenn jedes Protein seinen isoelektrischen Punkt erreicht hat. Sie wird heute fast ausschließlich in Gelmedien durchgeführt.

Die theoretische Grundlage für die IEF wurde von Svensson (1961; 1962) entwickelt. Praktisch realisierbar wurde sie durch die Einführung der synthetischen Trägerampholyte durch Vesterberg (1969). Diese stellen ein heterogenes Gemisch von Isomeren aliphatischer Oligoamino-Oligocarbonsäuren dar, die eng benachbarte isoelektrische Punkte besitzen.

Die Trägerampholyte haben

- eine hohe Pufferkapazität und Löslichkeit am pI,
- eine gute und gleichmäßige Leitfähigkeit am pI,
- ein niedriges Molekulargewicht
- und treten nicht in Interaktion mit den zu trennenden Substanzen.

Diese Trägerampholyte werden ungebunden in das Fokussierungsgel integriert und sind vor dem Start ungerichtet über die gesamte Gelstrecke verteilt, so daß das Gel einen einheitlichen Durchschnitts-pH-Wert erhält.

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die positiv geladenen Trägerampholyten zur Kathode, die negativ geladenen zur Anode. Die Moleküle mit den extremsten pIs wandern dabei bis zu den jeweiligen Enden des Gels, die anderen Ampholyte ordnen sich dazwischen gemäß der Reihenfolge ihrer pIs an. So entsteht ein monoton steigender pH-Gradient (Abb. 5.2 /1). Dies ist allerdings in den seltensten Fällen ein linearer Gradient, wie vereinfachend auf der Abbildung angenommen. Vielmehr wird er durch geschickte Auswahl der Zusammensetzung der Trägerampholyte dem aufzutrennenden Proteingemisch angepaßt, so daß meist Regionen in der Mitte der Gele gestreckt und Randzonen gestaucht sind.

Da die Proteine ein wesentlich größeres Molekulargewicht als die Trägerampholyten und damit einen deutlich geringeren Diffusionskoeffizienten besitzen, beginnen sie erst nach der Ausbildung des pH-Gradienten, sich in diesen einzulagern. Sie fokussieren in scharfen Banden an ihrem isoelektrischen Punkt. Weiterführende Betrachtungen finden sich beispielsweise bei Dunn und Burghes (1983a).

Kurz erwähnt werden soll hier noch die Technik der immobilisierten pH-Gradienten, die die IEF mit Trägerampholyten in der Zukunft immer mehr verdrängen wird. Ein wesentlicher Vorteil liegt dabei in der Vermeidung der Kathodendrift, auf die bei der herkömmlichen IEF sorgfältig geachtet werden muß. Dies geht mit einer Erweiterung des Spektrums im alkalischen Bereich und einer Erhöhung der Reproduzierbarkeit einher. Außerdem ist das problemlose Maßschneiden auch extrem flacher pH-Gradienten möglich. Detailliertere Ausführungen sind bei Görg et al. (1988) nachzulesen. In der eigenen Arbeitsgruppe wird die erste Dimension derzeit auf immobilisierte pH-Gradienten umgestellt, die hier präsentierten Studien sind jedoch alle mit der herkömmlichen IEF durchgeführt.

5.2.2 Material

Die isoelektrische Fokussierung wurde in der Tube Cell Model 175 durchgeführt, als Netzgerät diente das 1000/500 Power Supply (beides BIO-RAD, München). Die Gele wurden in Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm und einer Länge von 21 cm gegossen (Eydam, Kiel). Dazu wurden selbstgebaute Gießkammern verwendet, die ein gleichzeitiges Gießen von 7 bzw. 19 Gelen erlaubten (rund, Innendurchmesser 3 cm, Höhe 18,5 cm, Einlaß unten). Zur Probenapplikation wurde eine Microliter-Spritze 710 (Hamilton, Darmstadt) mit Sterican Einmal-Injektions-Kanülen 0,90 x 70 mm (B. Braun, Melsungen) benutzt.

Als Trägerampholyten fanden Ampholine von BDH (Promochem, Wesel) Verwendung. Die weiteren Chemikalien und die Zusammensetzung der Gele und Elektrodenpuffer finden sich im Anhang.

5.2.3 Durchführung

Im wesentlichen lag der Analytik das Protokoll von Hochstrasser, D.F. et al. (1988a) zugrunde. Es wurden Polyacrylamid-Röhrchengele verwendet (Länge 16 cm, Durchmesser 1,5 mm) mit einem nicht linearen pH-Gradienten von pH 4,0 bis 8,0. Als Quervernetzer wurde statt des allgemein üblichen Bisacrylamids (Bis) Piperazindiacrylamid (PDA) eingesetzt. Bei Einsatz von PDA in der ersten Dimension kann die Streifenbildung in der zweiten Dimension reduziert werden (Hochstrasser, D.F. et al., 1988b).

Die Konzentrationen der Gele waren 4 % T und 2,6 % C (T = totale Acrylamidkonzentration, C = Konzentration des "Crosslinkers" PDA, bezogen auf den Acrylamidgehalt). Die Polymerisation wurde initiiert mit TEMED und Ammoniumpersulfat. Neben den Trägerampholyten waren CHAPS, NP-40 und Harnstoff im Gel enthalten.

Die Proben wurden mit einer Microliter-Spritze an der Kathode auf die Röhrchengele appliziert. Die Fokussierungsbedingungen waren 200 V für 2 h, 500 V für 5 h und 1000 V für 10,5 h. Dies ergab 13400 Vh oder 52,3 Vh/cm² (Voris und Young, 1980).

5.3 Transfer und SDS-PAGE

5.3.1 Grundlagen

Die SDS-Elektrophorese wurde 1967 von Shapiro et al. eingeführt und später als fester Bestandteil in die zweidimensionale Elektrophorese integriert. Sie wird ebenfalls in erster Linie in Polyacrylamid-Gelen durchgeführt.

Die Proteine werden nach der Auftrennung durch die IEF mit SDS versetzt und von diesem Mizellar eingeschlossen. Dadurch werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt, die entstandenen anionischen Mizellen besitzen ein konstantes Nettoladung-Masse-Verhältnis, so daß sie die gleiche Mobilität besitzen. (Hierfür werden unterschiedliche Werte angegeben: 1,2 g SDS pro g Protein (Reynolds und Tanford, 1970); 1,4 g SDS pro g Protein (Westermeier, 1990)). Da die Proteine nach Auflösung der Tertiär- und Sekundärstrukturen als gestreckte Aminosäureketten und die Mizellen damit als Ellipsoide vorliegen, ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungsstrecken der Mizellen. Dieser lineare Bereich erstreckt sich zwar nur über einen gewissen Teil des Gels, abhängig vom Größenverhältnis Molekülmasse zum Porendurchmesser, kann aber durch die Verwendung von Porengradienten-Gelen erweitert werden (Westermeier, 1990). Weiterführende Ausführungen finden sich wiederum u.a. bei Dunn und Burghes (1983a).

5.3.2 Material

Für den Transfer wurden 2-ml-Spritzen (B. Braun, Melsungen) und 100 µl Eppendorf-Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg) verwendet.

Die SDS-PAGE wurde in zwei Protean II 2-D Multi-Cells in Verbindung mit einem 1000/500 Power Supply durchgeführt. Die Gele wurden in der Protean-II-Multi-Gel-Gießkammer mit Hilfe des Gradientenformers Model 375 gegossen (alle Geräte BIO-RAD, München). Die verwendeten Chemikalien und die Zusammensetzung der Gele und Puffer sind im Anhang zu finden.

5.3.3 Durchführung

Erneut wurde im wesentlichen nach Hochstrasser, D.F. et al. (1988a) gearbeitet. Die Röhrchengele der IEF wurden mit einer 2-ml-Spritze mit aufgesteckter 100 µl Eppendorf-Pipettenspitze aus den Glasröhrchen extrudiert und mit dem Transfer-Puffer versetzt, der neben dem SDS u.a. noch Bromphenolblau als Frontmarkierer enthielt. Die Gele wurden danach unverzüglich an die Gelplatten der zweiten Dimension angelegt.

Die Gele waren 16 x 16 cm groß und 1,5 mm dick. Sie enthielten einen linearen Acrylamidgradienten von 8 bis 18 % T und 2,6 % C. Wiederum wurde PDA als Quervernetzer genommen, dessen Verwendung sich in der zweiten Dimension insbesondere durch eine deutlich reduzierte Hintergrundfärbung während der Silberfärbung und eine verbesserte Auflösung bemerkbar macht (und so den nicht ganz unerheblichen Preis rechtfertigt) (Hochstrasser, D.F. et al., 1988b; Hochstrasser und Merrill, 1988). Außerdem zeigen PDA-Gele eine erhöhte Stabilität, sie können bis zu einem Monat im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Gele enthielten TRIS-HCl pH 8,8 und Natriumthiosulfat, die Polymerisation wurde mit TEMED und Ammoniumpersulfat initiiert. Die Elektrodenpuffer enthielten TRIS, Glycin und SDS.

Insbesondere um einen zügigen Transfer von der ersten zur zweiten Dimension zu gewährleisten und mögliche quantitative Proteinverluste zu vermeiden (Tracy et al., 1982), wurde die maximale Anzahl der Gele eines Laufes auf acht beschränkt. In zwei Protean II 2-D Multi Cells wurden jeweils die beiden äußeren Kühlkerne mit je 2 Gelen beschickt. Eine Besonderheit dieser Elektrophorese-Kammern ist das effektive Kühlsystem, das die Temperatur während eines Laufes nur von 8°C auf 12°C ansteigen ließ. Die vorgegebene Stromstärke betrug 40 mA / Gel. Ein Lauf dauerte etwa 4,5 h, in denen die Spannung von ca. 140 V auf ca. 420 V anstieg.

5.4 Silberfärbung

5.4.1 Grundlagen

Unmittelbar nach Beendigung des Laufes der zweiten Dimension folgt die Fixierung, die zwei Ziele hat: (i) die schnelle Fällung der aufgetrennten Proteine in der Gelmatrix und damit die Überführung diffundierender

Moleküle in unlösliche Präzipitate, und (ii) die Entfernung jeglicher im Gel vorhandener Komponenten, die keine Proteine darstellen und die sich anschließende Detektion durch Anfärbung behindern würden.

Die Silberfärbung zur Proteindetektion in Polyacrylamidgelen wurde zum ersten Mal 1979 von Merrill et al. präsentiert. Der dieser Methode zugrunde liegende Mechanismus ist die Reduktion von ionischem zu metallischem Silber. Zu einer Detektion eines Proteins kommt es, wenn dieses ein unterschiedliches Redoxpotential im Vergleich zum umgebenden Gel hat. Die meisten verwendeten Protokolle führen zu höheren Redoxpotentialen der Proteine, so daß es zu einer positiven Anfärbung kommt (Merrill, 1987).

Oft werden die Gele vor Zusatz der Silberionen beispielsweise mit Paraformaldehyd oder Glutaraldehyd vorbehandelt. Dies ist zwar nicht zwingend erforderlich, erhöht aber die Sensitivität der nachfolgenden Silberfärbung erheblich. Der genaue Mechanismus ist hierbei nicht bekannt, diskutiert wird die Umwandlung von gebundenen Silberionen in metallisches Silber, das die Deposition weiterer Silberionen nach sich zieht. (Dunn und Burghes, 1983b).

Nach sorgfältiger Entfernung des Überschusses Aldehyd wird eine Silbernitratlösung zugesetzt. Eine weitverbreitete Möglichkeit ist die Verwendung ammoniakalischer Lösungen, so daß sowohl Silberionen als auch ammoniakalische Silberionen $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ mit den Proteinen Komplexe bilden können (Dunn und Burghes, 1983b). Die genauen Mechanismen bzw. die tatsächlich reagierenden Gruppen der Proteine sind nicht bis ins letzte bekannt, es gibt aber Hinweise, daß nicht eine generelle funktionelle Gruppe für die Färbung verantwortlich ist, sondern daß die unterschiedlichen Aminosäuren sich sehr unterschiedlich verhalten. Besondere Bedeutung scheinen dabei die basischen Aminosäuren zu haben (Heukeshoven und Dernick, 1985; Merrill, 1987). Abschließend werden die mit den Proteinen komplexierten Silberionen zu metallischem Silber reduziert.

Die Silberfärbung zeichnet sich besonders durch ihre hohe Sensitivität aus: Für die meisten Proteine liegt sie zwischen 0,05 und 0,10 ng/mm² (Merrill et al., 1982). Damit erreicht die Silberfärbung eine um mehr als das 100-fache höhere Sensitivität als die ebenfalls sehr gebräuchliche Färbung mit Coomassie Blue.

Poehling und Neuhoff (1981) geben eine lineare Beziehung zwischen der Dichte der Silberfärbung und der Proteinkonzentration über einen 30-fachen

Konzentrationsbereich an, Merrill et al. (1982) sogar über einen 40-fachen. Zu beachten ist hierbei also, daß der lineare Bereich endlich ist. Vor allem aber ist wesentlich, daß die Steigung der Geraden (Dichte der Silberfärbung/Protein-konzentration) von Protein zu Protein variiert. Für eine absolute Quantifizierung erlaubt dies streng genommen nur den Inter-Gel-Vergleich *eines* bestimmten Proteins. Ein absoluter quantitativer Vergleich zweier unterschiedlicher Proteine ist mit dieser Methode trotz aller sonstigen Vorteile nicht möglich (Merrill, 1987).

5.4.2 Material und Durchführung

Es wurde eine Schüttelmaschine KS (Buehler, Tübingen) und Glaswannen der Firma Glaswerke Wertheim verwendet, außerdem Plastikwannen. Im wesentlichen lagen die Protokolle von Oakley et al. (1980) und Hochstrasser, D.F. et al. (1988b) zugrunde. Sämtliche Schritte des Färbeprotokolls wurden auf der Schüttelmaschine durchgeführt, für alle Waschschritte wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

1. Waschen der Gele mit H_2O (5-10 min).
2. Fixierung: EtOH (40 %) / Essigsäure (10 %) / H_2O (60 min),
3. EtOH (5 %) / Essigsäure (5 %) / H_2O (über Nacht).
4. Waschen mit H_2O (5 min).
5. Versetzen mit Glutaraldehyd (10 %), H_2O (30 min).
6. Intensives Waschen mit H_2O (3 x 10 min, 4 x 30 min).
7. Färbung: $AgNO_3$ (0,8 % G/V), NH_3 (0,33 %), NaOH (0,02 N) in H_2O (30 min).
8. Waschen mit H_2O (3 x 5 min).
9. Entwicklung : Citronensäure (0,01 % G/V), Formaldehyd (0,037 %) in H_2O (Reduktion zu metallischem Silber).
10. Stop der Entwicklung: Essigsäure (5 %).

5.5 Laser-Densitometrie

5.5.1 Grundlagen

Eine zuverlässige Analyse hochauflösender Elektrophorese-Trennungen muß eine wirklichkeitsgetreue, verzerrungslose Aufzeichnung der Spots gewährleisten und Meßdaten liefern, die proportional zur Absorption sind.

In jedem Fall sollte im Transmissionsmodus gemessen werden, da bei Messungen in der Reflexion große Fehler durch Streulicht auftreten.

Für richtige und lineare Meßwerte ist eine ausreichende Intensität der Lichtquelle erforderlich. Da bei hochauflösenden Elektrophoresen optische Dichten (O.D.) bis zu 4 O.D. erreicht werden können, ist der Einsatz eines Lasers als Lichtquelle anzuraten (1 O.D.: Menge eines Stoffs, die in 1 ml gelöst in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von 1 ergibt). Im Gegensatz zu konventionellem weißen Licht können mit einem Laser auch in diesem Bereich noch lineare Messungen vorgenommen werden. Der Laser besitzt zwar eine nicht variierebare Wellenlänge, hat jedoch mit nur einer Spektrallinie eine extrem schmale Bandbreite, was zu einer optimalen Reproduzierbarkeit führt (Westermeier et al., 1988).

Um richtige Meßwerte zu erhalten, d. h. zur wirklichkeitsgetreuen Aufzeichnung, ist eine hohe Auflösung notwendig, wobei das Auflösungsvermögen eines Densitometers durch die Breite des Lichtstrahls, die Schrittweite des Transportmotors und die Tiefenschärfe bestimmt wird. Ein breiter Lichtstrahl kann zu Verfälschungen beim Scannen der Ränder eines Spots oder sehr schmaler Spots führen. Bei konventionellem Licht ist die Verkleinerung der Spaltbreite zur Reduzierung der Breite des Lichtstrahls durch die resultierende Abnahme der Lichtintensität limitiert (ca. 100 μm). Dahingegen besitzt ein Laserstrahl auch bei einer Breite von 50 μm noch die oben geforderte Intensität. Darüberhinaus wird mit einem Laser eine höhere Tiefenschärfe erreicht (Westermeier et al., 1988; Westermeier, 1990).

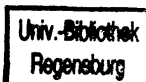
5.5.2 Gerät und Durchführung

Es wurde ein Personal Densitometer (Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland) mit einem 1 mW Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 632,5 nm und einer einstellbaren Breite von 50 bzw. 100 μm verwendet. Die Gele wurden feucht auf dem Probenblett plaziert und vermessen. Die Signalauflösung betrug 4096 Stufen optischer Dichte (12 bit).

5.6 Auswertung

5.6.1 Grundlagen

Die durch die Messung mit dem Densitometer erzeugte große Datenmenge (> 7 MB / Gel) erfordert zur Verarbeitung eine leistungsfähige Software.



Eingesetzt wurde die Software MELANIE (*Medical E*lectrophoresis *A*nalysis *I*nteractive *E*xpert system), die an der Universität Genf in der Arbeitsgruppe Hochstrasser speziell für die Auswertung von 2D-PAGE-Gelen entwickelt wurde (Appel et al., 1991).

Die einzelnen Spots des Gels müssen von der Software auch als solche detektiert werden. Die Schwierigkeit dabei ist, daß die Spots oft unvollständig aufgelöst sind, d. h. ein kleinerer Spot erscheint beispielsweise als "Schulter" eines größeren. Die Techniken zur Auflösung der Spots lassen sich klassifizieren in parametrische (in denen Spots an eine Modellform angepaßt werden) und nicht-parametrische (in denen keine bestimmte Spotform vorausgesetzt wird). Die parametrische Methode nimmt für die Spots von vornherein meist eine Gaußsche Form an. Diese idealisierte Form ist in der Praxis jedoch häufig durch mehrere Faktoren gestört, insbesondere durch benachbarte Spots, Hintergrund des Gels oder Streifenbildungen (Miller, 1989). Daher wurde in MELANIE diese sonst häufig verwendete Methode durch die nicht-parametrische ersetzt. Es wird eine Technik verwendet, die die Methoden der schrittweisen Schwellenwertbildung (Vo et al., 1981) und der Bildung der zweiten Ableitung entlang der Spotoberflächen (Lemkin und Lipkin, 1981) kombiniert. Für eine weiterführende Darstellung sei auf Lemkin und Lipkin (1981) und Olson und Miller (1988) verwiesen. Aus den optischen Dichten der einzelnen Pixel eines Spots werden die quantitativen Angaben für die Spots berechnet. Neben den Koordinaten auf dem Gel macht die Software für jeden Spot u.a. eine absolute Mengenangabe, die zusätzlich als Prozentsatz von der Gesamtmenge des Gels angegeben wird.

Auf der 2D-Plasmakarte (Mastergel des Humanplasmas) sind die Positionen der einzelnen Proteine genau bekannt und reproduzierbar (Anderson und Anderson, 1991; Golaz et al., 1993). Zwar sind viele Proteine namentlich bzw. bezüglich ihrer Funktion noch nicht bekannt, vielen sind aber vorläufige Codenamen zugeordnet worden, so daß sie ebenfalls eindeutig erkannt werden können (Anderson und Anderson, 1991; Golaz et al., 1993). Die Zuordnung der Spots auf dem 2D-Gel zu den einzelnen Proteinen aufgrund ihrer eindeutigen Position kann daher in einer gut untersuchten Gesamtheit wie dem Humanplasma visuell erfolgen, d. h. erfordert nicht notwendigerweise zusätzliche Identifizierungsmethoden (z.B. Immunoblotting), wie sie beispielsweise nach der SDS-PAGE benötigt werden. Im Verlauf des Projektes waren in zwei Fällen bestimmte Spotgruppen von Bedeutung, die keinen bisher beschriebenen Proteinen zugeordnet werden konnten, jedoch im Plasma enthalten sind. Diese wurden

in dieser Arbeit an den entsprechenden Stellen mit Protein A und B bezeichnet.

Die Abb. 5.6 /1 zeigt ein typisches Gel des Humanplasmas, in dem einige Hauptproteine gekennzeichnet sind.

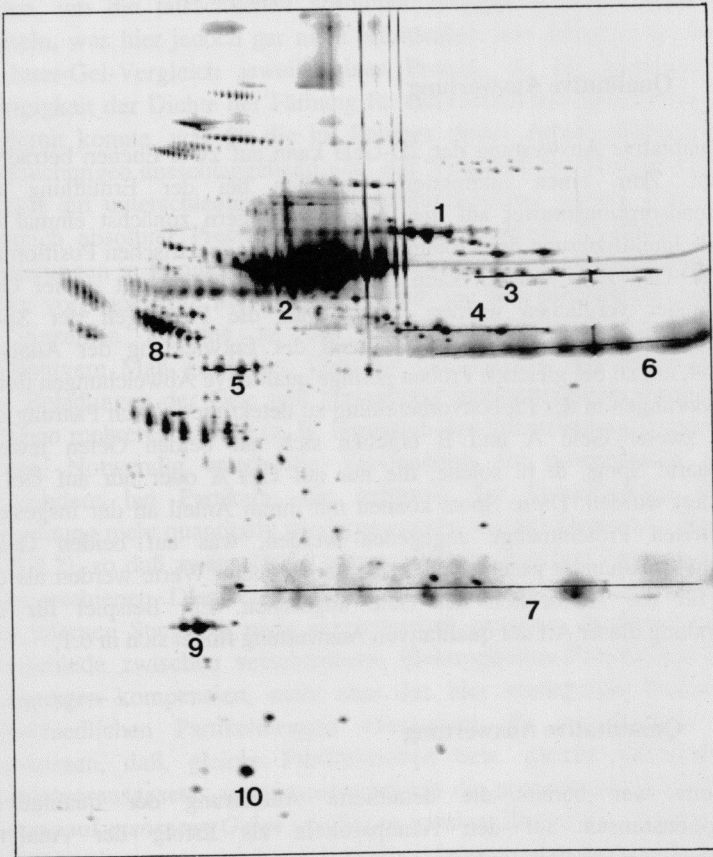


Abb. 5.6 /1: 2D-Gel des Humanplasmas. (Applikation: 0,3 μ l Plasma).

(1) Transferrin, (2) Albumin, (3) Fibrinogen α , (4) Fibrinogen β , (5) Fibrinogen γ , (6) IgG γ , (7) Ig leichte Ketten, (8) α 1-Antitrypsin, (9) Apolipoprotein A-I, (10) Transthyretin.

Abgebildet ist das gesamte Gel, pI 4 - 8 (von links nach rechts, nicht linear), MG 6 - 250 kDa (von unten nach oben, nicht linear).

Die qualitative Identifizierung der Proteine bzw. die quantitative Analytik eines einzelnen Geles ist meist von relativ geringem Interesse, erst der Vergleich mit anderen ergibt oft einen hohen Gehalt an Information. Um mehrere Gele effizient miteinander vergleichen zu können, werden sogenannte "Matching"-Algorithmen verwendet, die es erlauben, die gleichen Spots auf verschiedenen Gelen einander zuzuordnen, d. h. miteinander zu paaren (Miller, 1989; Appel et al., 1991).

5.6.2 Qualitative Auswertung

Die qualitative Auswertung der 2D-Gele kann auf zwei Ebenen betrachtet werden. Zum einen interessiert natürlich bei der Ermittlung der Proteinadsorptionsmuster auf den Arzneistoffträgern zunächst einmal die visuelle Identifizierung der Proteine aufgrund ihrer spezifischen Position auf dem 2D-Gel. Zum anderen kann die qualitative Ähnlichkeit zweier Gele miteinander verglichen werden, indem man die Paarungen der Spots betrachtet. Dies war besonders während der Entwicklung der Analytik sinnvoll, um so bei gleichen Proben geringe qualitative Abweichungen durch Veränderungen in der Probenvorbereitung zu detektieren. Nach Paarung der Spots zweier Gele A und B ergeben sich auf beiden Gelen jeweils ungepaarte Spots, d. h. solche, die nur auf Gel A oder nur auf Gel B detektiert wurden. Diese Spots können mit ihrem Anteil an der insgesamt detektierten Proteinmenge angegeben werden, was auf beiden Gelen getrennt voneinander geschieht. Die sich ergebenden Werte werden als ein Maß für die Ähnlichkeit der Gele angesehen. Ein Beispiel für die Anwendung dieser Art der qualitativen Auswertung findet sich in 6.1.

5.6.3 Quantitative Auswertung

Einerseits war bereits die detaillierte Aufklärung der qualitativen Adsorptionsmuster auf den Nanopartikeln als Erfolg der Analytik anzusehen. Andererseits jedoch, da in den meisten Fällen relativ ähnliche Oberflächen verglichen wurden, adsorbierten oft die gleichen Proteine, wobei sich allerdings die Mengen unterschieden. Die Proteinmengen werden von der Software MELANIE in *cpm* (counts per minute) angegeben, da sie aus der Software ELSIE (Olson und Miller, 1987) heraus entwickelt wurde, die vornehmlich der Auswertung von Gelen dient, in denen die Proteine mittels Radiographie detektiert worden sind. Für mittels Silberfärbung

detektierte Proteine ist dies lediglich eine abstrakte Einheit der absoluten Menge. Eine konkrete Angabe wie beispielsweise ng hätte jedoch keine größere Aussagekraft, wäre im Gegenteil sogar irreführend, da, wie bereits unter 5.4 beschrieben, die Proteinkonzentration-Silberfärbungsdichte-Kurven proteinspezifisch sind, d. h. gleiche Mengen unterschiedlicher Proteine auf einem Gel durchaus unterschiedliche Werte annehmen können. Es müßte daher für jedes Protein eine eigene Kalibrierung vorgenommen werden, um die tatsächlichen absoluten Mengen einzelner Proteine zu ermitteln, was hier jedoch gar nicht erforderlich war. Möglich ist dagegen der Inter-Gel-Vergleich jeweils eines Protein, da die Konzentrationsabhängigkeit der Dichte der Färbung für ein Protein auf allen Gelen gleich ist. Somit konnte, was für die im Rahmen dieser Arbeit unternommenen Untersuchungen ausschlaggebend war, der Vergleich der Mengen einzelner Proteine auf unterschiedlichen Partikeln durchgeführt werden. Der direkte Vergleich absoluter Proteinmengen auf verschiedenen Partikeln (s. auch Erläuterungen in Kapitel 7) wurde stets innerhalb eines elektrophoretischen Laufes vorgenommen. Meist wurde jedoch mit den prozentualen Anteilen der einzelnen Proteine an der Gesamtproteinmenge des Gels als quantitativem Maß gearbeitet. Dies hat den Vorteil, daß unterschiedlich hohe Beladungen der Gele und geringfügig unterschiedliche Bedingungen zwischen mehreren Läufen (z. B. bezüglich der Silberfärbung) kompensiert werden. Notwendig wurde die Verwendung der prozentualen Anteile insbesondere bei Partikeln, die aufgrund der komplizierten Probenvorbereitung nicht quantitativ wiedergewonnen werden konnten (s. Kapitel 9 und 6.3.2), so daß zwangsläufig unterschiedliche absolute Mengen auf den Gelen erschienen. Dies wäre auch durch den ansonsten denkbaren Einsatz eines internen Standards nicht auszugleichen gewesen, da dieser lediglich Unterschiede zwischen verschiedenen Elektrophorese-Protokollen bzw. -bedingungen kompensiert, nicht aber das hier vorliegende Problem der unterschiedlichen Partikelmengen überwindet. Es sei deutlich darauf hingewiesen, daß, gleiche Partikelpuben bzw. gleiche Gesamtproteinmengen vorausgesetzt, insbesondere jeweils die prozentualen Anteile *eines Proteins auf mehreren Gelen* verglichen werden. Zusätzlich suggerieren die Prozentangaben zwar auch tatsächliche Mengenverhältnisse der Proteine eines Gels untereinander, sie sind jedoch aufgrund der oben beschriebenen Proteinspezifität bezüglich der Silberfärbung stets nur als semi-quantitative Aussage zu betrachten. Die Hauptproteine der Adsorptionsmuster und insbesondere die Unterschiede zwischen den Arzneistoffträgern lassen sich dennoch, wie im Laufe des Projekts gezeigt werden konnte, mit dieser Methode gut herausarbeiten.

Experimenteller Teil - Ergebnisse und Diskussion

6 Entwicklung der 2D-PAGE-Analytik

Bevor die differenzierte Untersuchung unterschiedlicher Arzneistoffträger und deren Oberflächenmodifikationen durchgeführt wurde, wurde die 2D-PAGE-Analytik selbst auf beeinflussende Faktoren untersucht. Da erst die neuartige Verknüpfung der Probenvorbereitung, bestehend aus Inkubation der Partikel im Plasma, Separation der Partikel und Desorption der adsorbierten Proteine, mit der schon bestehenden 2D-PAGE die detaillierte Analytik der Proteinadsorption möglich machen sollte, lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung und Etablierung der Probenvorbereitung.

Verschiedene Modellpartikel und unterschiedliche Mengen bzw. Beladungen der Gele wurden zu diesem Zweck verwendet, um gleichzeitig Erfahrung mit unterschiedlichen Systemen hinsichtlich ihrer Abtrennbarkeit vom Plasma, der benötigten Partikelmengen und der Bandbreite der zu erwartenden Adsorptionsmuster zu gewinnen.

6.1 Reproduzierbarkeit

Um die Ergebnisse der folgenden Kapitel leichter bewerten zu können, sei eine Darstellung der Reproduzierbarkeit der Methode vorangestellt. In vier Proben wurden unmodifizierte Polystyrol-Latexpartikel (750 µl) mit einem Durchmesser von 1000 nm (PS 1000) unabhängig voneinander routinemäßig in Plasma (750 µl) inkubiert. Die Partikel wurden jeweils durch fünf Zentrifugations- und Waschschrte abgetrennt (5 x 5 min., 15000 g). Die Abbildung 6.1 /1 zeigt exemplarisch zwei Gele.

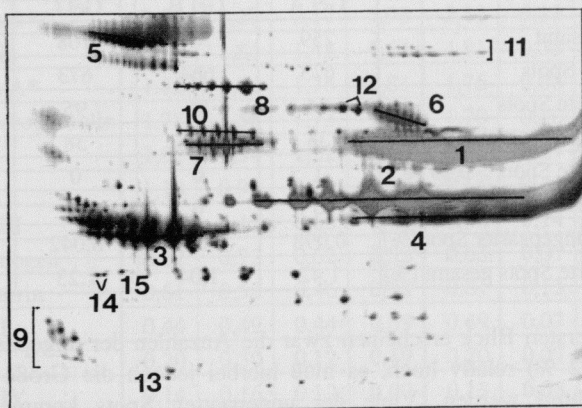
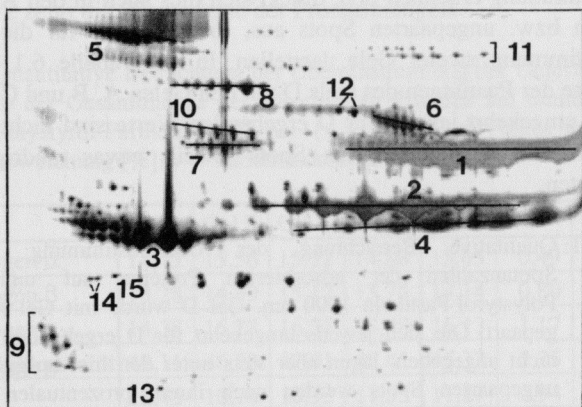


Abb. 6.1 /1: 2D-PAGE-Gele: Adsorbierte Proteine auf unmodifizierten Polystyrol-Partikeln 1000 nm. Gel A (oben) und Gel B (unten), s. Tab. 6.1 /1 u. 6.1 /2.

(1) Fibrinogen α , (2) Fibrinogen β , (3) Fibrinogen γ , (4) IgG γ , (5) PLS:6, (6) Protein B, (7) Albumin, (8) Protein A, (9) ApoJ, (10) IgD δ , (11) Plasminogen, (12) Transferrin, (13) ApoE, (14) ApoA-IV, (15) Actin. Abszisse: nicht linearer Gradient pI 4,8 - 8, Ordinate: nicht linearer Gradient MG 30 - 110 kDa.

Nachdem bereits die bloße Betrachtung der Gele ein hohes Maß an Übereinstimmung erkennen ließ, drückt sich dies auch in den Anzahlen der gepaarten bzw. ungepaarten Spots aus, die ein Maß für die qualitative Übereinstimmung zweier Gele darstellen. In der Tabelle 6.1 /1 sind die Ergebnisse der Paarungen des Gels D mit den Gelen A, B und C aufgelistet. Die sich umgekehrt jeweils für D ergebenden Werte sind nicht aufgeführt, lagen aber für die ungepaarten Spots jeweils etwas niedriger als die aufgeführten.

Tab. 6.1 /1: Qualitative Betrachtung der Übereinstimmung der Gele: Spotanzahlen der adsorbierten Proteine auf unmodifizierten Polystyrol-Partikeln 1000 nm. Gel D wurde mit Gel A, B und C gepaart. Die sich jeweils umgekehrt für D ergebenden Werte sind nicht angegeben, lagen aber stets unter den hier aufgeführten. Die ungepaarten Spots werden nach ihrem prozentualen Anteil am Gesamtgel eingeteilt.

	Gel A	Gel B	Gel C	Gel D
Spots gesamt	759	744	768	736
gepaarte Spots	675	664	673	-
ungepaarte Spots	84	80	95	-
ungepaarte Spots > 0,01 %	33	29	38	-
ungepaarte Spots > 0,05 %	1	0	0	-
ungepaarte Spots > 0,1 %	0	0	0	-
größter ungepaarter Spot [%]	0,098	0,056	0,042	-
ungepaarte Spots gesamt [%]	1,42	1,04	1,23	-

Auf den ersten Blick erscheinen zwar die Anzahlen der ungepaarten Spots (bis zu 12 %) relativ hoch, es muß hierbei jedoch die Größe der Spots berücksichtigt werden. Viele der ungepaarten Spots kommen dadurch zustande, daß zwar der gleiche Spot in zwei Gelen vorhanden ist, im ersten Gel allerdings knapp über, im zweiten knapp unter der Detektionsgrenze liegt. Dies führt dazu, daß der Spot in der Spotliste des zweiten Gels nicht auftaucht und es so zu einem ungepaarten Spot des ersten Gels kommt. Die allermeisten ungepaarten Spots besitzen daher einen extrem geringen Anteil an der Gesamtmenge, und es gab in dieser Untersuchung nur einen ungepaarten Spot mit einem Anteil > 0,05 %, so daß der höchste hier gemessene Gesamtanteil der ungepaarten Spots an der adsorbierten Proteinmenge lediglich 1,42 % betrug.

In der quantitativen Betrachtung der Gele kommt die Konzentration des Hauptanteils der Proteinmenge in wenigen Spots zum Ausdruck: Etwa 70 %

des Gesamtanteils (Fibrinogen, IgG γ , Ig leichte Ketten, PLS:6, Albumin, Protein B) sind in durchschnittlich 130 Spots (~ 18 %) enthalten. Die Tabelle 6.1 /2 zeigt die Einzelwerte der Proteinmengen.

Tab. 6.1 /2: Quantitative Betrachtung der Übereinstimmung der Gele: Mengen in % der Gesamtmenge der adsorbierten Proteine auf unmodifizierten Polystyrol-Partikeln 1000 nm. (x = Mittelwert [%], s = Standardabweichung [%], v = Variationskoeffizient in %).

Protein	Gel A	Gel B	Gel C	Gel D	x	s	v
Fibrinogen α	14,45	15,56	15,32	14,88	15,05	0,49	3,26
Fibrinogen β	13,28	14,39	15,12	13,75	14,14	0,80	5,65
Fibrinogen γ	14,38	16,78	16,57	16,78	16,13	1,17	7,25
Fibrinogen gesamt	42,11	46,73	47,01	45,41	45,32	2,25	4,96
IgG γ	12,45	10,74	10,33	11,55	11,27	0,94	8,32
Ig leichte Ketten	4,23	5,12	4,82	4,66	4,71	0,37	7,88
PLS:6*	6,36	5,23	5,54	6,78	5,98	0,72	11,99
Protein B*	2,06	2,27	2,17	1,98	2,12	0,13	5,98
Albumin	2,28	1,84	1,48	1,64	1,81	0,35	19,13
Protein A*	1,82	1,64	1,76	1,81	1,76	0,08	4,70
α 2-Macroglobulin	1,78	1,56	1,73	1,72	1,70	0,10	5,62
ApoJ	1,02	1,54	1,22	1,06	1,21	0,24	19,53
IgD δ	1,18	0,97	1,24	1,16	1,14	0,12	10,26
ApoC-III	0,75	0,45	0,66	0,76	0,66	0,14	21,97
Plasminogen	0,62	0,72	0,62	0,55	0,63	0,07	11,15
Transferrin	0,61	0,58	0,46	0,78	0,61	0,13	21,73
ApoA-I	0,44	0,49	0,44	0,59	0,49	0,07	14,43
ApoE	0,20	0,30	0,12	0,19	0,20	0,07	36,60
ApoA-IV	0,14	0,16	0,12	0,09	0,13	0,03	23,42
Transthyretin	0,11	0,08	0,12	0,15	0,12	0,03	25,10
Actin	0,08	0,12	0,09	0,09	0,10	0,02	18,23
ApoC-II	0,05	0,13	0,05	0,08	0,08	0,04	48,71
gesamt	82,44	79,86	80,03	77,84	80,04	1,88	2,35

* PLS:6 ist ein bisher noch unidentifiziertes Protein und ist benannt nach Anderson und Anderson (1991). Die Proteine A und B sind ebenfalls nicht identifiziert und nur in dieser Arbeit so benannt (siehe auch Abb. 6.1 /1).

Für die Anteile der einzelnen Proteine in den vier Gelen wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten ermittelt. Für das dominierende Protein, das Fibrinogen (45,32 %), ergab sich ein Variationskoeffizient von unter 5 %, ansonsten wurden die Variationskoeffizienten tendenziell mit abnehmendem Mittelwert größer. Die Proteine mit geringem Anteil an der Gesamtmenge sind hier beispielhaft aufgeführt, um einerseits die größeren Abweichungen aufzuzeigen. Anteile unter 2 % sind mit Variationskoeffizienten nicht selten über 20 % behaftet, in diesem Fall für die Apolipoproteine E und C-II sogar bis zu 37 bzw 49 %. Andererseits demonstrieren diese Daten aber auch, daß in allen Gelen ein bestimmtes Protein, sei es nun eines der stärker vertretenen oder eines mit extrem geringem Anteil, in der gleichen Größenordnung vorliegt. Die sich ergebende qualitative und quantitative Reproduzierbarkeit der Methode mit Abweichungen in gleich geringen Ausmaßen bestätigte sich in den folgenden Untersuchungen auch an anderen Partikeln.

6.2 Proteindesorption

Die Desorptionsrate der adsorbierten Proteine wurde, wie bereits unter 5.1.3 erwähnt, mittels BCA-Assay mit über 90 % bestimmt. Exemplarisch wurden dazu mit Poloxameren überzogene und unmodifizierte 1000 nm Polystyrol-Partikel verwendet.

Danach wurde mit 2D-PAGE überprüft, ob vor Auftragung auf die isoelektrische Fokussierung, d. h. nach Desorption der Proteine von den Partikeln, eine Abtrennung der Partikel von der Proteinlösung notwendig war. Eine Probengruppe (unmodifizierte Polystyrol-Partikel, 1000 nm) wurde fünf Minuten zentrifugiert (15000 g), wobei die Partikel aufgrund der geringeren Dichte gegenüber der Desorptionslösung aufschwammen. Mit einer dünnen Kanüle wurde durch die Partikelschicht hindurchgestochen, die Lösung mit den desorbierten Proteinen entnommen und diese auf die IEF aufgetragen. In der anderen Probengruppe (gleiche Partikel) wurden die Partikel belassen und mit aufgetragen. Die IEF wurde durch die Partikel nicht gestört, und die resultierenden Gele der beiden Gruppen zeigten keinerlei Unterschiede, so daß in den weiteren Untersuchungen die Partikel in den Proben belassen wurden.

6.3 Separation der Partikel vom Plasma

Eine der Hauptschwierigkeiten der Probenvorbereitung lag in der Abtrennung der Partikel vom freien Plasma nach erfolgter Inkubation und Adsorption der Proteine an die Partikel. Es mußte einerseits gewährleistet sein, daß durch das Separationsverfahren keine ursprünglich adsorbierten Proteine abgeschert wurden, andererseits sollte das freie Plasma effektiv entfernt werden, um keine freien Proteine versehentlich mit auf die Gele zu bringen.

6.3.1 Zentrifugation

Zur Untersuchung der Zentrifugation wurden unmodifizierte Polystyrol-Partikel mit einem Durchmesser von 480 nm (PS 480) eingesetzt. 100 µl Partikelsuspension wurden in 200 µl Plasma inkubiert. Es wurde jeweils 1 h mit 15000 g im Eppendorf-Inkubationsgefäß zentrifugiert. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand (Lösung mit freien Proteinen) abpipettiert und verworfen, wobei jedesmal Reste des Überstandes im Gefäß verblieben. Die Partikel wurden in bidestilliertem Wasser redispersiert und erneut zentrifugiert. Da zur Abtrennung zumindest ein Zentrifugationsschritt notwendig ist, eine Analytik vor diesem also nicht möglich ist, konnten zunächst keine Aussagen über eine mögliche Proteinabscherung während dieses Schrittes gemacht werden. Dagegen konnten allerdings die weiteren Schritte untersucht werden. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde eine Probe analysiert, die außer den Partikeln mit den adsorbierten Proteinen stets eine geringe Menge umgebende Flüssigkeit mit freien Proteinen enthielt. Zusätzlich zu den die Partikel mit den adsorbierten Proteinen enthaltenden Proben wurde aus dem gleichen Gefäß eine geringe Menge Flüssigkeit ohne Partikel entnommen, die der aus der ersten Probe entsprach und nur freie Proteine enthielt.

In den Proben mit freien *und* adsorbierten Proteinen war eine kontinuierliche Verminderung einiger Proteine (freie Plasmaproteine) und die Konstanz anderer (adsorbierte Proteine) auf den Gelen auffällig. Über den fünften Zentrifugationsschritt hinaus änderte sich das Proteinmuster nicht mehr, da die freien Plasmaproteine offensichtlich ausgewaschen bzw. unter die Detektionsgrenze verdünnt worden waren. Die noch verbliebenen Proteine konnten als adsorbierte Proteine angesehen werden. Es blieb zu klären, ob die nach einem Zentrifugationsschritt auf den Partikeln adsorbierten Proteine auch noch nach fünf Schritten nachweisbar waren oder ob sich das

Adsorptionsmuster aufgrund der mechanischen Belastung durch die Zentrifugation veränderte.

Die Abb. 6.3 /1 zeigt jeweils einen Ausschnitt eines Gels von Proben, die die adsorbierten Proteine und freies Plasma nach der ersten Zentrifugation (oben), nur freies Plasma nach der ersten Zentrifugation (Mitte) und die adsorbierten Proteine nach der fünften Zentrifugation enthielten (unten).

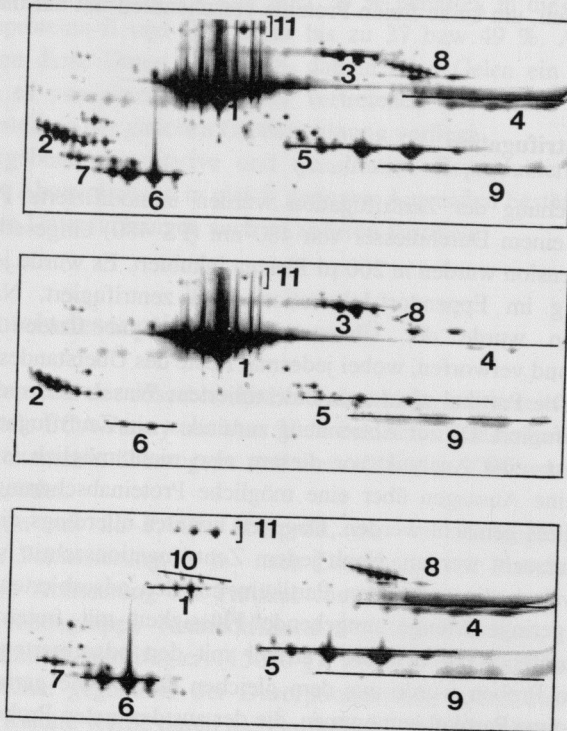


Abb. 6.3 /1: Untersuchung verschiedener Zentrifugationsschritte anhand von PS 480. Ausschnitte aus 2D-PAGE-Gelen:

Oben: adsorbierte Proteine und freies Plasma nach der *ersten* Zentrifugation, Mitte: freies Plasma nach der *ersten* Zentrifugation, unten: adsorbierte Proteine nach der *fünften* Zentrifugation.

(1) Albumin, (2) α 1-Antitrypsin, (3) Transferrin, (4) Fibrinogen α , (5) Fibrinogen β , (6) Fibrinogen γ , (7) Fibrinogen ext. γ , (8) Protein B, (9) IgG γ , (10) IgD δ , (11) Protein A.

Nach dem ersten Zentrifugieren und Abpipettieren verblieb noch eine relativ große Menge freies Plasma in der Probe, so daß die entsprechenden Gele (Abb. 6.3 /1 oben und Mitte) von den Albumin-Spots des Plasmas dominiert wurden. Auf dem Gel der adsorbierten Proteine nach der fünften Zentrifugation (Abb. 6.3 /1 unten) ist dagegen nur noch eine geringe Menge Albumin vorhanden. Ähnliches gilt für α 1-Antitrypsin und Transferrin, die nach der fünften Zentrifugation kaum noch detektierbar waren. Diese drei Proteine waren somit nur in sehr kleiner Menge oder gar nicht auf den Partikeln adsorbiert. Andererseits fanden sich die verschiedenen Ketten des Fibrinogens in sehr ähnlich großem Ausmaß auf dem oberen und unteren Gel, auf dem mittleren jedoch nur geringfügig, woraus geschlossen werden konnte, daß das Fibrinogen auf den Partikeln stark vertreten war. Gleiches gilt auch für das Protein B. Da es sich bei den drei gezeigten Gelen um vergleichbare Beladungen handelte, d. h. die Partikelmengen in der oberen und unteren Probe bzw. die Mengen des freien Plasmas in der oberen und mittleren Probe annähernd gleich waren, konnten die absoluten Proteinmengen (in cpm) miteinander verglichen werden. Rechnerisch sollten die Proteine der beiden unteren Gele addiert die Proteine des oberen ergeben. Dies ist graphisch in Abb. 6.3 /2 dargestellt, in die noch einige weitere markante Proteine aufgenommen wurden, so daß sich zusammen jeweils über 90 % der Proteinmenge der Gele ergab.

Der optische Eindruck der Gele wurde bestätigt: Die addierten Mengen der freien Proteine nach erster Zentrifugation und der adsorbierten Proteine nach fünfter Zentrifugation (rechter Balken) stimmten mit den Mengen der freien und adsorbierten Proteine nach erster Zentrifugation (linker Balken) im Rahmen der Analysegenauigkeit gut überein. Es konnte geschlossen werden, daß durch die auf den ersten Zentrifugationsschritt folgenden Schritte keine Proteindesorption erfolgte. Als auffällig in Abb. 6.3 /2 soll hier noch das IgG γ erwähnt werden, für das nach Subtraktion der beiden Proben mit freiem Plasma (cpm: $19,5 - 13,3 = 6,2$) nur noch eine geringe Menge im Gel der auf den Partikeln adsorbierten Proteine nach der fünften Zentrifugation erwartet worden war. Dagegen wurde in diesem Gel eine deutlich größere Menge (17,5 cpm) gefunden, was für eine zusätzliche Adsorption während des zweiten bis fünften Zentrifugationsschrittes aufgrund von sich verändernden Löslichkeitsverhältnissen sprechen konnte. Es handelte sich hier zwar um relativ gesehen geringe Mengen, so daß das Phänomen noch nicht überbewertet wurde, es trat später allerdings auch bei anderen Partikeln und tatsächlich nur für IgG wieder auf (6.3.2, 9.1.3).

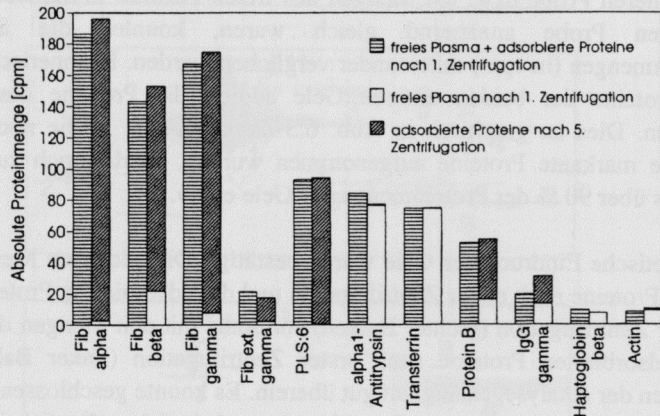
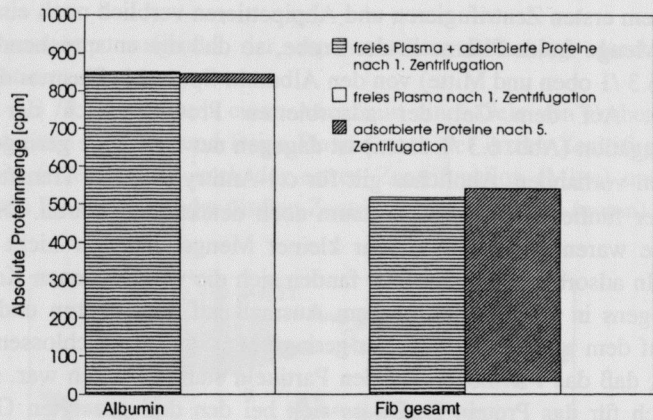


Abb. 6.3 /2: Untersuchung verschiedener Zentrifugationsschritte anhand von PS 480. Linker Balken: adsorbierte Proteine und freies Plasma nach der *ersten* Zentrifugation, rechter Balken: freies Plasma nach der *ersten* Zentrifugation und adsorbierte Proteine nach der *fünften* Zentrifugation. Während der Zentrifugationsschritte fand keine Desorption adsorbierter Proteine statt.

In Versuchen mit veränderten Zentrifugationsbedingungen (5000 - 25000 g, entsprechend verlängerte bzw. verkürzte Zeiten) wurden nach ebenfalls fünf Zentrifugationen im Vergleich zu den entsprechenden präsentierten Gelen keine Unterschiede in den Adsorptionsmustern detektiert, so daß der Einsatz der gewählten Bedingungen (5 x 1 h, 15000g) fortgesetzt werden konnte. Daß sich keine Unterschiede durch die veränderte mechanische Belastung

der adsorbierten Proteine ergaben, konnte als Indiz dafür gewertet werden, daß während des ersten Zentrifugationsschrittes unter den gewählten Bedingungen keine Desorption stattfand, da es als unwahrscheinlich angesehen wurde, daß durch unterschiedliche mechanische Beanspruchung genau gleiche Desorptionserscheinungen auftreten. Weitere Ausführungen hierzu finden sich unter 6.3.2.

Das oben angewendete Additions-/Subtraktionsverfahren, bei dem nur ein Zentrifugationsschritt benötigt würde, eignet sich unter mehreren Gesichtspunkten nicht für die Routineanalytik. Es ist äußerst schwierig, gleiche absolute Mengen des freien Plasmas in den beiden Proben nach der ersten Zentrifugation wie im obigen Beispiel reproduzierbar zur Analytik zu bringen, da der Partikelpellet in der einen Probe ein unbekanntes Volumen einnimmt. Wie schon unter 5.6.3 angedeutet, würde auch hier ein Standard, unmittelbar vor der IEF zugesetzt, das Problem nicht lösen, da die Proben zu diesem Zeitpunkt bereits unterschiedliche Mengen Plasma enthalten können. Ein Standard müßte schon dem Plasma spätestens vor der Zentrifugation zugesetzt werden, was aber wiederum durch Interaktion mit den adsorbierten Plasmaproteinen bzw. den Partikeln zu Verfälschungen führen könnte. Kritisch zu betrachten ist in jedem Fall die Subtraktion zweier großer Mengen freien Plasmas voneinander, um eine kleine Menge der tatsächlich adsorbierten Proteine zu ermitteln. Schließlich werden einige adsorbierte Proteine von der großen Menge Albumin des freien Plasmas schlicht überdeckt, so daß sie durch Subtraktion nicht oder nur fälschlich detektierbar sind. Auch durch große Mengen anderer Proteine wie beispielsweise Fibrinogen kann es zu Überlappungen mit benachbarten Proteinen kommen. Daher sind im gezeigten Beispiel bereits jeweils geringe Plasma- und Partikelmengen gewählt worden. Dennoch sind die auf den Partikeln adsorbierten IgD δ und Protein A auf den Gelen nach der ersten Zentrifugation gar nicht sichtbar bzw. durch das Albumin teilweise verdeckt (Abb. 6.3 /1). Aus den aufgeführten Gründen wurde für die weiteren Versuche der höhere Aufwand der fünfmaligen Zentrifugation, mit der eindeutige Adsorptionsmuster erzielt werden konnten, als erforderlich angesehen.

6.3.2 Filtration

Alternativ zur Zentrifugation wurde die statische Mikrofiltration mit Membranen eingesetzt. Durch die andersartige Belastung der adsorbierten Proteine sollte die Gültigkeit des durch die Zentrifugation ermittelten Adsorptionsmusters überprüft werden. Außerdem wurde durch die Filtration

eine gegenüber der Zentrifugation deutlich schnellere Beendigung des Inkubationsprozesses möglich, was für die Analytik der Adsorptionskinetik im Sekundenbereich wichtig war (s. Kap. 8).

PS 480 (200 µl) wurden nach Inkubation in 400 µl Plasma sofort durch einen Polycarbonat-Filter 0,1 µm filtriert und mit insgesamt 40 ml destilliertem Wasser auf dem Filter gewaschen, um Reste des freien Plasmas zu entfernen. Anschließend wurden die Partikel vorsichtig mit Hilfe eines Spatels vom Filter abgelöst und zur Analytik gebracht. Naturgemäß wurden die Partikel dabei nicht quantitativ zurückgewonnen, was allerdings nicht weiter störte, da die relativen Mengen der adsorbierten Proteine betrachtet werden sollten. Für die später unternommenen Kinetikstudien konnte erleichternd und den Partikelverlust minimierend etwas Wasser zum Ablösen der Partikel vom Filter verwendet werden, da die entstehende verdünnte Suspension durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt aufkonzentriert werden konnte. Für den hier angestrebten Vergleich zwischen Filtration und Zentrifugation war dies jedoch nicht geeignet.

Die Abb. 6.3 /3 zeigt Ausschnitte der Gele filtrierter (unten) und zentrifugierter Proben (oben, gleiches Inkubationsverhältnis, Zentrifugation wie in 6.3.1).

Die gute optische Übereinstimmung der beiden Gele drückte sich auch in der qualitativen Analytik aus: Es ergaben sich keine ungepaarten Spots > 0,1 %, nur 2 bzw. 5 waren > 0,05 % und der Gesamtanteil der ungepaarten Spots belief sich auf < 3 %. Die etwas höheren prozentualen Abweichungen gegenüber der Untersuchung in 6.1 ergeben sich aus der deutlich geringeren Beladung der hier gezeigten Gele: Ein gerade über der Detektionsgrenze liegender kleiner Spot, der leicht als ungepaarter auftreten kann, fällt prozentual bei geringerer Gelbeladung stärker ins Gewicht.

Die quantitative Betrachtung ergab ebenfalls keine relevanten Unterschiede (Abb. 6.3 /4). Fibrinogen war mit 66 % bzw. 67,8 % in beiden Gelen deutlich das Hauptprotein, die übrigen Proteine besaßen ebenfalls gleiche bzw. sehr ähnliche Anteile, wobei Schwankungen jeweils im Rahmen der Analysegenauigkeit lagen. Die Gleichheit der Adsorptionsmuster nach Zentrifugation und Filtration wurde auch mit weiteren Proben bestätigt (PS 480 und PS 1000, jeweils modifiziert mit Poloxamer 407).

Eine Ausnahme bildete auch hier wieder das IgG. Im oben gezeigten Beispiel wurden nach Zentrifugation 2,08 % detektiert, nach Filtration jedoch nur 0,05 %. Noch deutlicher wurde dieses Phänomen in den Proben von mit Poloxamer 407 modifizierten 480 nm Partikeln (PS 480-407). Bei ansonsten gleichen Gelen hatte IgG γ auf dem Gel nach Zentrifugation einen

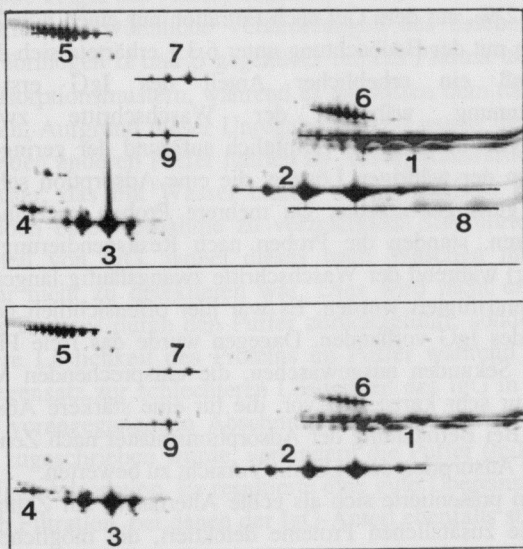


Abb. 6.3 /3: Separation der Partikel vom Plasma: Vergleich der Adsorptionsmuster nach Zentrifugation (oben) und Filtration (unten).

(1) Fib α , (2) Fib β , (3) Fib γ , (4) Fib ext. γ , (5) PLS:6, (6) Protein B, (7) Protein A, (8) IgG γ , (9) Albumin.

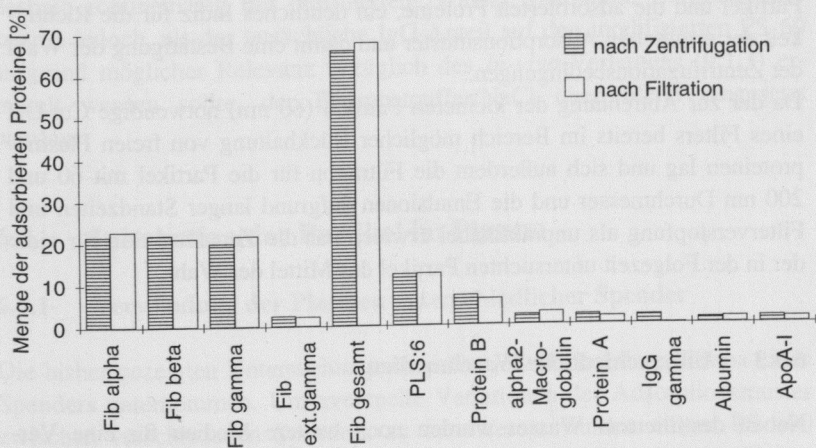


Abb. 6.3 /4: Separation der Partikel vom Plasma: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Proteine auf PS 480 nach Zentrifugation und Filtration.

Anteil von 12 %, auf dem Gel nach Filtration nur einen von 2,3 %. Im Zusammenhang mit der Beobachtung unter 6.3.1 erhärtete sich damit die Vermutung, daß ein erheblicher Anteil des IgG erst durch die Plasmaverdünnung während der Waschschrirte zwischen den Zentrifugationen adsorbierte, vermutlich aufgrund der geringer werdenden Löslichkeit in der wäßrigen Lösung, die eine Adsorption schließlich doch energetisch günstiger machte. Da mehrere Proben nacheinander zu bearbeiten waren, standen die Proben nach Resuspendierung der Partikel (Verdünnung) während der Waschschrirte zwangsläufig längere Zeit, bevor sie erneut zentrifugiert wurden. Es war hier offensichtlich genug Zeit zur Adsorption des IgG vorhanden. Dagegen wurde das freie Plasma bei der Filtration in Sekunden ausgewaschen, die entsprechenden Verdünnungen lagen also nur sehr kurze Zeit vor, die für eine stärkere Adsorption nicht ausreichten. Bei Betrachtung der Adsorptionsmuster nach Zentrifugation ist demnach die Adsorption des IgG mit Vorsicht zu bewerten.

Die Filtration präsentierte sich als echte Alternative zur Zentrifugation. Es wurden keine zusätzlichen Proteine detektiert, die möglicherweise durch Adsorption freier Plasmaproteine an den Membranfilter und späteres gemeinsames Ablösen mit den Partikeln auf die Gele hätten gelangen können. Auch die Verwendung von Celluloseacetat-Filtern führte zu keiner Veränderung der Proteinmuster.

Umgekehrt war, von IgG abgesehen, die Gleichheit der Gele nach Zentrifugation und Filtration, d. h. nach gänzlich unterschiedlicher Belastung für die Partikel und die adsorbierten Proteine, ein deutliches Indiz für die Richtigkeit der ermittelten Adsorptionsmuster und damit eine Bestätigung der Wahl der Zentrifugationsbedingungen.

Da der zur Abtrennung der kleineren Partikel (60 nm) notwendige Cut-Off eines Filters bereits im Bereich möglicher Rückhaltung von freien Plasmaproteinen lag und sich außerdem die Filtration für die Partikel mit 60 und 200 nm Durchmesser und die Emulsionen aufgrund langer Standzeiten und Filterverstopfung als unpraktikabel erwies, war die Zentrifugation für viele der in der Folgezeit untersuchten Partikel das Mittel der Wahl.

6.3.3 Unterschiedliche Waschmedien

Neben destilliertem Wasser wurden noch weitere Medien für eine Verwendung in den Waschschrirten während der Separation getestet. Dabei handelte es sich um Phosphatpuffer pH 7,4 mit NaCl 0,9 %, Krebspuffer pH 7,4 und HEPES-Puffer pH 7,4 (Zusammensetzung siehe Anhang). In Ver-

suchen mit PS 480 zeigte das Adsorptionsmuster nach Waschen der Partikel mit HEPES-Puffer ungewöhnliche Veränderungen des Erscheinungsbildes der Spots für Fibrinogen α und β gegenüber reinem Plasma und den sonst detektierten Adsorptionsmustern, während es ansonsten dem nach Waschen mit Wasser glich. Aufgrund dieser Unregelmäßigkeit wurde der Puffer verworfen. Die beiden anderen Puffer führten zu Adsorptionsmustern, die dem Adsorptionsmuster, das mit Wasser erzielt wurde, glichen. Für alle drei Puffer war jedoch eine Ausnahme zu verzeichnen: Sie führten zu einem geringeren Anteil von IgG, wobei dieses nach Waschen mit Phosphatpuffer/NaCl gar nicht zu detektieren war. Dies wird nicht etwa auf eine Desorption des Proteins durch den Puffer zurückgeführt, sondern vielmehr auf eine bessere Löslichkeit des Proteins im Puffer während der Waschschrte. Im Gegensatz zur schlechteren Löslichkeit des IgG in Wasser, der bereits in den vorangegangenen Abschnitten die Adsorption während der Waschschrte zugeschrieben wurde, verhindern die Puffer (teilweise) diese nachträgliche IgG-Adsorption. Es resultierte eine gute Übereinstimmung mit den Gelen nach Filtration, bei denen der IgG-Anteil ebenfalls stark reduziert war.

Allerdings sind die Puffer nicht universell für alle Arzneistoffträgersysteme einsetzbar. Bei der Probenvorbereitung der Emulsionen, zumindest der mit ionischen Emulgatoren, würden die Puffer zu erheblichen Beeinträchtigungen bzw. zu Zerstörung der Systeme führen. Um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Trägersystemen zu wahren, wurde deshalb routinemäßig mit destilliertem Wasser gearbeitet. Darüberhinaus konnte jedoch, als der tatsächliche IgG-Anteil auf den modifizierten PS 60 aufgrund möglicher Relevanz bezüglich des *In-vivo*-Verhaltens (9.1.3) ermittelt werden sollte, der Phosphatpuffer/NaCl überprüfend eingesetzt werden.

6.4 Inkubation der Partikel im Plasma

6.4.1 Verwendung der Plasmen unterschiedlicher Spender

Die bisher gezeigten Untersuchungen wurden jeweils mit dem Plasma eines Spenders unternommen. Um eventuelle Variationen der Adsorptionsmuster zwischen verschiedenen Spendern zu detektieren, wurden erneut PS 480 (100 μ l) verwendet und im Frischplasma (200 μ l) von vier unterschiedlichen Spendern (A-D) inkubiert. Die Tab. 6.4 /1 zeigt die jeweiligen prozentualen Anteile der adsorbierten Proteine.

Tab. 6.4 /1: Quantitative Betrachtung der adsorbierten Proteine auf PS 480 nach Inkubation in den Plasmen unterschiedlicher Spender. (x = Mittelwert [%], s = Standardabweichung [%], v = Variationskoeffizient in %).

Protein	Spender A	Spender B	Spender C	Spender D	x	s	v
Fibrinogen α	17,03	18,60	20,74	20,20	19,14	1,68	8,76
Fibrinogen β	15,61	17,79	19,58	18,41	17,85	1,67	9,34
Fibrinogen γ	16,83	16,42	14,57	17,64	16,37	1,30	7,94
Fibrinogen ext. γ	1,79	1,90	1,40	2,08	1,79	0,29	16,05
Fibrinogen gesamt	56,28	54,71	56,29	58,33	56,40	1,48	2,63
PLS:6	10,68	7,31	9,02	8,73	8,94	1,38	15,47
Protein B	2,79	5,35	8,21	8,52	6,22	2,69	43,33
α 2-Macroglobulin	3,76	4,07	3,83	4,39	4,01	0,28	7,09
IgG γ	3,56	4,12	4,18	2,25	3,53	0,90	25,41
Albumin	2,26	2,04	3,36	2,27	2,48	0,59	23,95
Protein A	1,70	1,34	1,53	1,16	1,43	0,23	16,32
ApoA-I	1,53	1,19	0,77	0,86	1,09	0,35	31,80
Plasminogen	0,28	0,72	0,71	0,81	0,63	0,24	37,72
C3 α	0,35	0,36	0,60	0,61	0,48	0,14	30,09
gesamt	83,19	81,21	88,50	87,93	85,21	3,57	4,19

Insgesamt ergab sich eine gute Übereinstimmung der Gele, die auf keine generellen Abweichungen durch die Verwendung verschiedener Plasmen schließen ließ. Die Anteile und damit der Stellenwert im Adsorptionsmuster waren für fast alle Proteine sehr ähnlich. Besonders auffällig war lediglich das Protein B, das für seinen relativ hohen Anteil, in zwei Gelen über 8 %, einen ungewöhnlich hohen Variationskoeffizienten besaß. Ein Blick auf die Gele selbst bestätigte die Spenderspezifität hinsichtlich des Anteils dieses Proteins (Abb. 6.4 /1). Es bestand in den Plasmen A und B aus einem Zug Spots, in den Plasmen C und D aus zwei Zügen, wodurch bereits ein Unterschied in der Menge resultierte. Zusätzlich waren aber auch die Mengen auf A und B unterschiedlich.

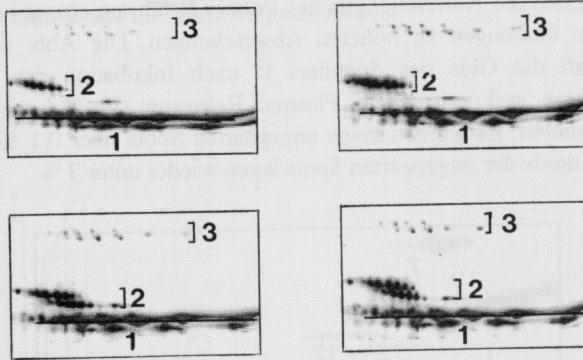


Abb. 6.4 /1: Spenderspezifität hinsichtlich des Anteils des Protein B nach Adsorption auf PS 480.
Spender A (links oben), B (rechts oben), C (links unten) und D (rechts unten). (1) Fibrinogen α , (2) Protein B, (3) Plasminogen.

Die Betrachtung der ungepaarten Spots als Maß für die qualitative Übereinstimmung der Gele spiegelte die bisherigen Beobachtungen wider: Es wurden alle Gele untereinander gepaart, wobei sich generell keine ungepaarten Spots über 0,1 % der jeweiligen gesamten Proteinmenge fanden und der Gesamtanteil der ungepaarten Spots jeweils unter 3 % lag. Lediglich bei Paarungen der Gele A bzw. B mit den Gelen C bzw. D ergaben sich für die Gele C und D auch wenige Spots zwischen 0,1 und 0,8 % und Gesamtanteile der ungepaarten Spots bis zu 6,7 %. Dies war auf die Abweichungen des Protein B zurückzuführen.

6.4.2 Vergleich zwischen Frischplasma und gefrorenem Plasma

Es sollte untersucht werden, ob das Einfrieren des Plasmas bei -20°C einen verändernden Einfluß auf das resultierende Adsorptionsmuster hat. Zwar hatten Tracy et al. (1982) gezeigt, daß die Gele des reinen Plasmas selbst nur marginale Veränderungen aufwiesen, aber es bestand die Möglichkeit, daß sich die Adsorptionseigenschaften der Proteine durch das Gefrieren veränderten.

Die gleichen Plasmen aus 6.4.1 wurden nach einmaligem Einfrieren und Auftauen für die Inkubation der gleichen Partikel unter gleichen Bedingungen erneut verwendet. Bei der qualitativen Betrachtung der vier Gele ergaben sich wie in 6.4.1 Gesamtanteile der ungepaarten Spots unter

3 %, lediglich die Abweichungen des Protein B führten erneut bei den oben erwähnten Paarungen zu höheren Abweichungen. Die Abb. 6.4 /2 zeigt beispielhaft die Gele des Spenders D nach Inkubation der Partikel in Frischplasma und gefrorenem Plasma. Relevante Veränderungen waren nicht erkennbar. Es wurden keine ungepaarten Spots über 0,1 % detektiert, und die Anteile der ungepaarten Spots lagen wieder unter 3 %.

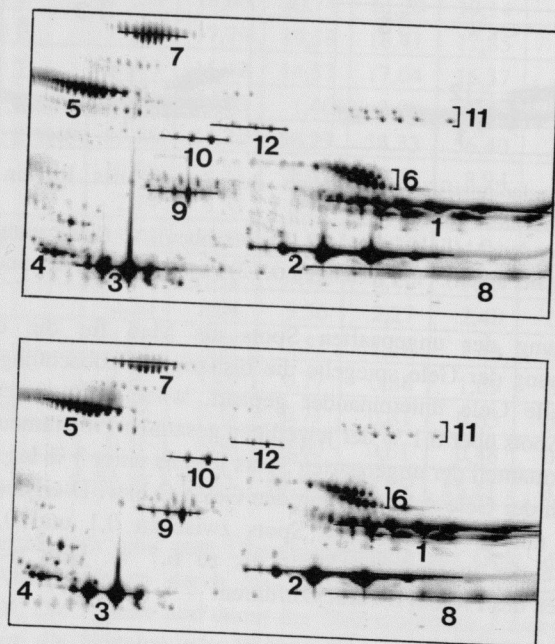


Abb. 6.4 /2: Vergleich der Adsorptionsmuster auf PS 480 nach Adsorption aus Frischplasma (oben) und gefrorenem Plasma (unten) des Spenders D. (1) Fibrinogen α , (2) Fibrinogen β , (3) Fibrinogen γ , (4) Fibrinogen ext. γ , (5) PLS:6, (6) Protein B, (7) α 2-Macroglobulin, (8) IgG γ , (9) Albumin, (10) Protein A, (11) Plasminogen, (12) C3 α .

In Abb. 6.4 /3 sind die Mittelwerte der vier Gele der Frischplasmen und der gefrorenen Plasmen gegenübergestellt. Allgemein waren sehr geringe Unterschiede zu verzeichnen, die unter Berücksichtigung der Analysegenauigkeit zu vernachlässigen waren. Das Fibrinogen erreichte insgesamt Mittelwerte von 56,4 % bzw. 59,5 %, was ebenfalls im Rahmen der üblichen Schwankungen lag. Auffällig war lediglich das PLS:6, das in allen vier Gelen der gefrorenen Plasmen einen um 1,9 % bis 3,6 % höheren

Anteil besaß. Die vergleichsweise großen Fehlerbalken des Protein B weisen noch einmal auf die Spenderspezifität hin.

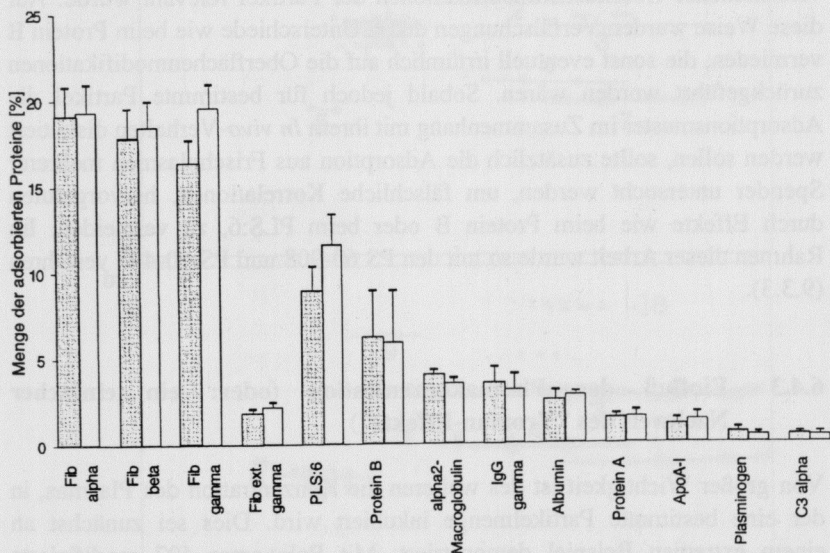


Abb. 6.4 /3: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Proteine auf PS 480 nach Adsorption aus Frischplasma (linke Balken) und gefrorenem Plasma (rechte Balken). Mittelwerte aus vier Versuchen, unterschiedliche Spender, (Fehlerbalken = Standardabweichung).

Zusammenfassend ist zu erkennen, daß sowohl die Verwendung der Plasmen unterschiedlicher Spender als auch die von gefrorenem Plasma gegenüber Frischplasma nur zu geringfügigen Abweichungen der Adsorptionsmuster führen. Während qualitativ keine Unterschiede detektiert werden konnten, kam es quantitativ für jeweils ein Protein (Protein B und PLS:6) zu erkennbaren Abweichungen. Daraufhin wurde entschieden, die meisten der folgenden Untersuchungen mit gefrorenem Plasma durchzuführen. Das Plasma wurde nach der Spende sofort portioniert und eingefroren, so daß jede Plasmaprobe nur einmal aufgetaut werden mußte. Die Proben fanden bis zu sechs Wochen nach Entnahme Verwendung, da in diesem Zeitraum keine Abweichungen in der Adsorption detektiert wurden. Für ältere Plasmaproben liegen keine gesicherten Erkenntnisse vor. Das Arbeiten mit gefrorenem Plasma hatte zum einen den Vorteil, daß die Zeitplanung der Versuche unabhängig von Blutspendeterminen der Blutbank

wurde. Noch wichtiger war jedoch, daß somit eine längere Versuchsreihe (über einen Lauf hinaus) mit demselben Plasma eines Spenders durchgeführt werden konnte, was beispielsweise bei der Testung der Auswirkungen verschiedener Oberflächenmodifikationen der Partikel relevant wurde. Auf diese Weise wurden Verfälschungen durch Unterschiede wie beim Protein B vermieden, die sonst eventuell irrtümlich auf die Oberflächenmodifikationen zurückgeführt worden wären. Sobald jedoch für bestimmte Partikel die Adsorptionsmuster im Zusammenhang mit ihrem *In vivo*-Verhalten diskutiert werden sollen, sollte zusätzlich die Adsorption aus Frischplasmen mehrerer Spender untersucht werden, um fälschliche Korrelationen, hervorgerufen durch Effekte wie beim Protein B oder beim PLS:6, zu vermeiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde so mit den PS 60-908 und PS 60-407 verfahren (9.3.3).

6.4.3 Einfluß der Plasmakonzentration (oder: ein einfacher Nachweis des "Vroman-Effekts")

Von großer Wichtigkeit ist des weiteren die Konzentration des Plasmas, in der eine bestimmte Partikelmenge inkubiert wird. Dies sei zunächst an einem extremen Beispiel demonstriert. Mit Poloxamer 407 modifizierte Polystyrol-Partikel (PS 1000-407) wurden in 0,08prozentigem, 0,8prozentigem und 80prozentigem Plasma inkubiert. Die Abb. 6.4 /4 zeigt die dazugehörigen Gele, die klare Unterschiede aufweisen. Da hier nur das Prinzip erläutert werden soll, wird von quantitativen Daten in der Diskussion abgesehen.

Auf dem Gel des Adsorptionsmusters aus 0,08prozentigem Plasma (a) war das Albumin am stärksten vertreten, außerdem eine größere Fraktion Transferrin. Daneben fanden sich kleinere Fraktionen des Fibrinogens und des IgGs. Im Adsorptionsmuster aus 0,8prozentigem Plasma (b) war Fibrinogen dann das dominierende Protein. Der Albumin-Anteil war jetzt geringer, stattdessen wurden Plasminogen, Protein A und bereits ApoC-III (nicht gezeigt) auf dem Gel detektiert. Letzteres wurde zusammen mit PLS:6 und ApoJ zu den Hauptproteinen auf dem Adsorptionsmuster aus dem 80prozentigen Plasma (c), das Fibrinogen war hier wieder nur gering vertreten.

Die Beispiele zeigen deutlich die Abhängigkeit der Proteinadsorption von der Plasmakonzentration. Gravierende qualitative und quantitative Unterschiede konnten detektiert werden, so daß von drei vollkommen unterschiedlichen Adsorptionsmustern gesprochen werden kann.

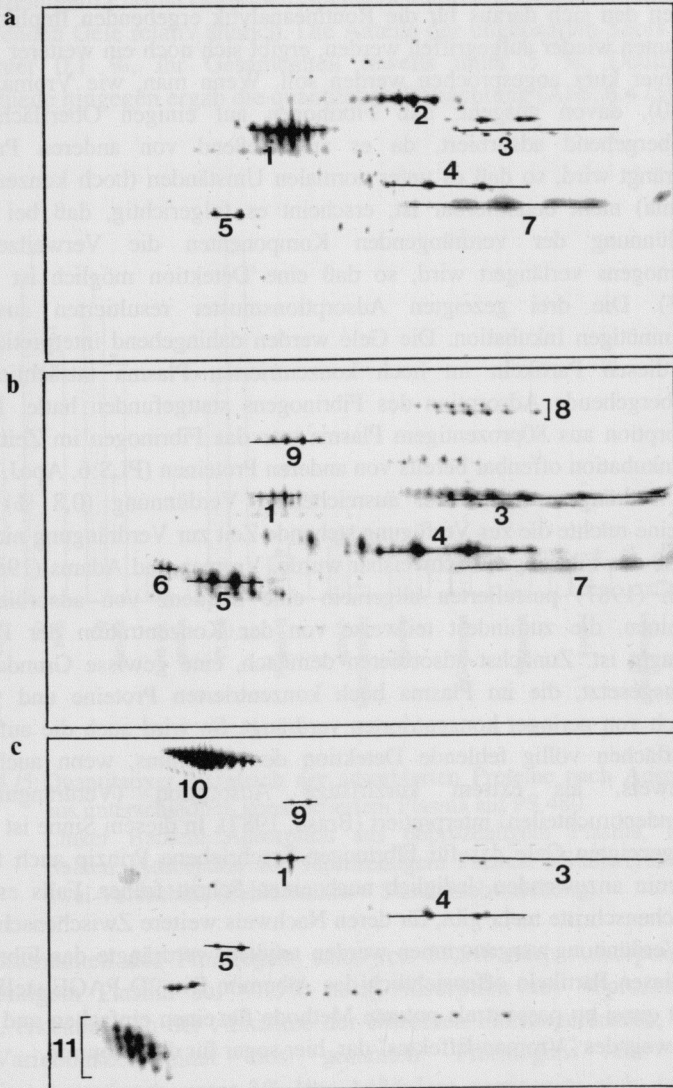


Abb. 6.4 /4: Unterschiedliche Adsorptionsmuster nach Adsorption aus unterschiedlich konzentriertem Plasma auf PS 1000-407.

(a) Adsorption aus 0,08prozentigem Plasma, (b) Adsorption aus 0,8prozentigem Plasma, (c) Adsorption aus 80prozentigem Plasma.

(1) Albumin, (2) Transferrin, (3) Fibrinogen α , (4) Fibrinogen β , (5) Fibrinogen γ , (6) Fibrinogen ext. γ , (7) IgG γ , (8) Plasminogen, (9) Protein A, (10) PLS:6, (11) ApoJ.

Neben den sich daraus für die Routineanalytik ergebenden Implikationen, die unten wieder aufgegriffen werden, ergibt sich noch ein weiterer Aspekt, der hier kurz angesprochen werden soll. Wenn man, wie Vroman et al. (1980), davon ausgeht, daß Fibrinogen auf einigen Oberflächen nur vorübergehend adsorbiert, da es anschließend von anderen Proteinen verdrängt wird, so daß es unter normalen Umständen (hoch konzentriertes Plasma) nicht detektierbar ist, erscheint es folgerichtig, daß bei starker Verdünnung der verdrängenden Komponenten die Verweilzeit des Fibrinogens verlängert wird, so daß eine Detektion möglich ist (Brash, 1987). Die drei gezeigten Adsorptionsmuster resultierten aus einer fünfminütigen Inkubation. Die Gele werden dahingehend interpretiert, daß auf diesen Partikeln im hoch konzentrierten Plasma tatsächlich eine vorübergehende Adsorption des Fibrinogens stattgefunden hatte. Bei der Adsorption aus 80prozentigem Plasma war das Fibrinogen im Zeitrahmen der Inkubation offenbar bereits von anderen Proteinen (PLS:6, ApoJ, ApoC-III) verdrängt worden. Bei ausreichender Verdünnung (0,8 %) dieser Proteine reichte die zur Verfügung stehende Zeit zur Verdrängung nicht aus, so daß das Fibrinogen nachweisbar wurde. Vroman und Adams (1986) und Brash (1987) postulierten allgemein eine Sequenz von adsorbierenden Proteinen, die zumindest teilweise von der Konzentration der Proteine abhängig ist. Zunächst adsorbieren demnach, eine gewisse Grundaffinität vorausgesetzt, die im Plasma hoch konzentrierten Proteine und werden danach von geringer konzentrierten verdrängt. So wird auch die auf vielen Oberflächen völlig fehlende Detektion des Albumins, wenn auch ohne Nachweis, als extrem kurzfristige Adsorption (Verdrängung in Sekundenbruchteilen) interpretiert (Brash, 1987). In diesem Sinne ist für die hier gezeigten Gele das für Fibrinogen beschriebene Prinzip auch für das Albumin anzuwenden, lediglich noch einen Schritt früher. Falls es keine Zwischenschritte mehr gibt, für deren Nachweis weitere Zwischenschritte in der Verdünnung vorgenommen werden müßten, verdrängte das Fibrinogen auf diesen Partikeln offensichtlich das Albumin. Die 2D-PAGE stellte sich damit quasi en passant als potente Methode für einen einfachen und klaren Nachweis des "Vroman-Effektes" dar, hier sogar für das Albumin.

Nachdem also mit obigen Gelen große qualitative Unterschiede bei der Adsorption aus relativ hoch und sehr gering konzentrierten Plasmen nachgewiesen werden konnten, zeigt der folgende Vergleich beispielhaft, wie die Unterschiede bei zwei höher konzentrierten Plasmen ausfallen können. Die aus den vorangegangenen Abschnitten bekannten PS 480 wurden in jeweils zwei Proben einerseits in 66prozentigem und andererseits

in 98prozentigem Plasma desselben Spenders inkubiert. Qualitativ waren die resultierenden Gele relativ ähnlich. Die Anteile der ungepaarten Spots lagen stets unter 0,1 %, ihr Gesamtanteil jeweils unter 5 %. Deutlichere Unterschiede hingegen ergab die quantitative Betrachtung (Abb. 6.4 /5).

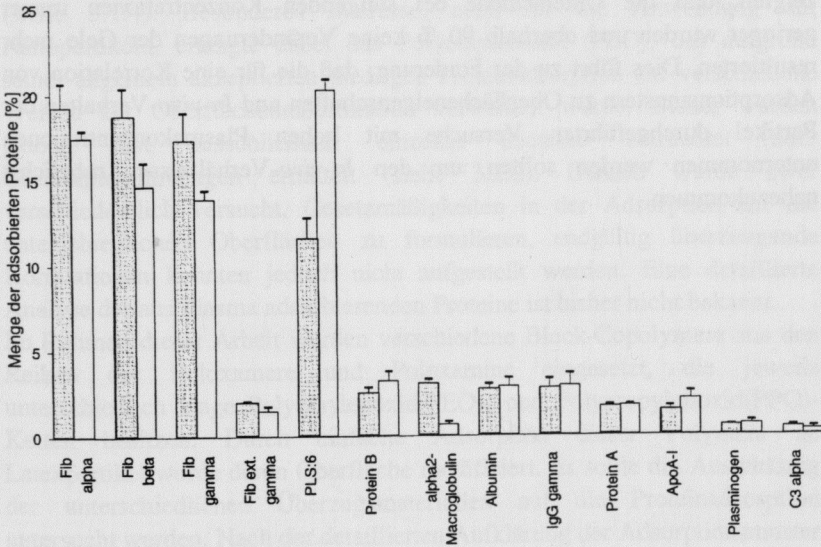


Abb. 6.4 /5: Quantitativer Vergleich der adsorbierten Proteine nach Adsorption aus unterschiedlich konzentriertem Plasma auf PS 480.
 Linker Balken: Adsorption aus 66prozentigem Plasma, rechter Balken: Adsorption aus 98prozentigem Plasma. Mittelwerte aus je zwei Versuchen, (Fehlerbalken = Standardabweichung).

Der Gesamtanteil des Fibrinogens sank von 57,2% nach Adsorption aus 66prozentigem Plasma auf 47,5% nach Adsorption aus 98prozentigem Plasma, erkennbar an der Abnahme der einzelnen Fibrinogenketten, wobei der Variationskoeffizient des gesamten Fibrinogens für beide Plasmakonzentrationen unter 3% lag. Außerdem verringerte sich das α 2-Macroglobulin von 3,1% auf 0,6%. Hingegen stieg der Anteil des PLS:6 in ähnlichem Maße wie das Fibrinogen abnahm, nämlich von 11,5% auf 20,2%. Die Abweichungen der übrigen Proteine befanden sich im Rahmen der Analysegenauigkeit.

Generell läßt sich sagen, daß im Gegensatz zu den sowohl qualitativ als auch quantitativ großen Unterschieden in den Bereichen geringer

Plasmakonzentration die Unterschiede zwischen den Adsorptionsmustern bei Verwendung verschiedener höherer Konzentrationen deutlich geringer sind. Im obigen Beispiel sind bereits keine relevanten qualitativen Abweichungen mehr zu verzeichnen, allerdings noch deutlich erkennbare quantitative. Weitere Erfahrungen mit anderen Partikeln (PS 1000, PS 60) zeigten, daß die Unterschiede bei steigenden Konzentrationen immer geringer wurden und oberhalb 90 % keine Veränderungen der Gele mehr resultierten. Dies führt zu der Forderung, daß die für eine Korrelation von Adsorptionsmustern zu Oberflächeneigenschaften und *In-vivo*-Verhalten der Partikel durchgeführten Versuche mit hohen Plasmakonzentrationen unternommen werden sollten, um den *In-vivo*-Verhältnissen möglichst nahezukommen.

7 Effekt der Oberflächenmodifikation auf die Proteinadsorption

In zahlreichen Studien wurde bereits versucht, durch Modifikation des Adsorbens die Proteinadsorption auf festen Oberflächen zu beeinflussen (siehe 3.1.4). Besonderes Interesse, auch für die Anwendung auf Nanopartikeln, erlangte dabei das Polyethylenoxid (PEO), das aufgrund seiner allgemein akzeptierten niedrigen Proteinadsorption auf verschiedene Weisen zur Oberflächenmodifikation verwendet wurde. Bisher wurden jedoch fast ausschließlich einzelne Proteine betrachtet oder Gesamtproteinmengen ermittelt (siehe 3.2.2). Danach wurde zwar verschiedentlich versucht, Gesetzmäßigkeiten in der Adsorption auf die unterschiedlichen Oberflächen zu formulieren, endgültig überzeugende Korrelationen konnten jedoch nicht aufgestellt werden. Eine detaillierte Analyse der aus Plasma adsorbierenden Proteine ist bisher nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Block-Copolymere aus den Reihen der Poloxamere und Poloxamine eingesetzt, die jeweils unterschiedlich lange Polyethylenoxid(PEO)- und Polypropylenoxid(PPO)-Ketten besitzen. Durch einfache Adsorption dieser Polymere an Latexpartikel wurde deren Oberfläche modifiziert. Es sollte die Auswirkung der unterschiedlichen Überzugsmaterialien auf die Proteinadsorption untersucht werden. Nach der detaillierten Aufklärung der Adsorptionsmuster schloß sich die Frage nach möglichen Korrelationen der Proteinadsorption mit den neu erworbenen Oberflächeneigenschaften an.

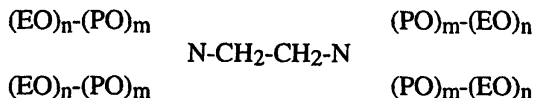
7.1 Proteinadsorption auf den modifizierten Nanopartikeln

7.1.1 Durchführung und resultierende Adsorptionsmuster

Die zur Oberflächenmodifikation verwendeten Poloxamere besitzen die allgemeine Strukturformel



Des weiteren wurde Poloxamine 908 eingesetzt, das ein ethoxyliertes Ethylendiamin mit sternförmiger Struktur darstellt.



Tab. 7.1 /1: Verwendete Block-Copolymere und ihre Kennzahlen.

Poloxamer	Molekulargewicht	EO-Einheiten (n)	PO-Einheiten (m)	n / m	HLB-Wert
184	2900	13	30	0,43	15
235	4600	27	39	0,69	16
237	7700	62	35	1,77	24
188	8350	75	30	2,50	29
238	10800	97	39	2,49	28
407	11500	98	67	1,46	22

Poloxamine 908	25000	121	16	7,56	>24
-------------------	-------	-----	----	------	-----

Es wurden Polystyrol-Partikel mit einem Durchmesser von 200 nm eingesetzt (PS 200), die in 90prozentigem Plasma inkubiert und 5 x 1 h bei 15000 g zentrifugiert wurden. Neben den überzogenen Partikeln wurden in einer weiteren Probe unmodifizierte Partikel untersucht, so daß sich insgesamt acht verschiedene Partikel ergaben, die innerhalb eines Laufes untersucht werden konnten. Die Abb. 7.1 /1 zeigt die unterschiedlichen Proteinadsorptionsmuster der Partikel.

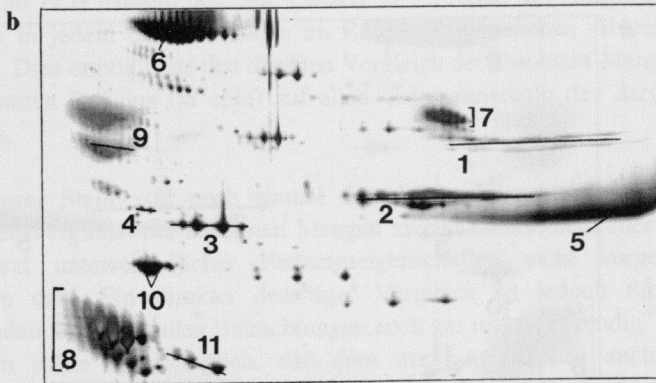
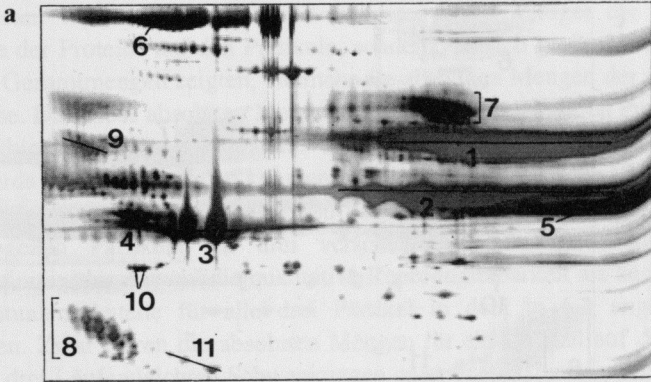


Abb. 7.1 /1: Proteinadsorptionsmuster auf unmodifizierten und mit verschiedenen Block-Copolymeren überzogenen Polystyrol-Partikeln.

a) PS 200, b) PS 200-235, c) PS 200-238, d) PS 200-407, [Abb. 7.1 /1 c) und d) s. nächste Seite]

(1) Fibrinogen α , (2) Fibrinogen β , (3) Fibrinogen γ , (4) Fibrinogen ext. γ , (5) IgG γ , (6) PLS:6, (7) Protein B, (8) ApoJ, (9) U2, (10) ApoA-IV, (11) ApoE. Abszisse: nicht linearer Gradient pI 4,8 - 8, Ordinate: nicht linearer Gradient MG 30 - 110 kDa.

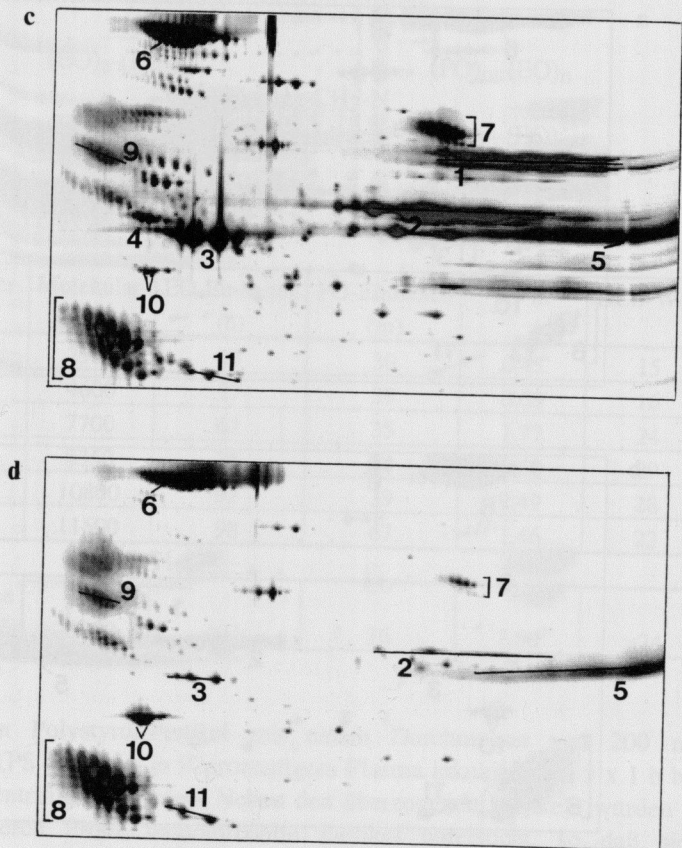


Abb. 7.1 /1: Proteinadsorptionsmuster auf unmodifizierten und mit verschiedenen Block-Copolymeren überzogenen Polystyrol-Partikeln.
a) PS 200, b) PS 200-235, c) PS 200-238, d) PS 200-407,
(Abb. 7.1 /1 a) und b) s. vorherige Seite).
(1) Fibrinogen α , (2) Fibrinogen β , (3) Fibrinogen γ , (4) Fibrinogen ext. γ , (5) IgG γ , (6) PLS:6, (7) Protein B, (8) ApoJ, (9) U2, (10) ApoA-IV, (11) ApoE. Abszisse: nicht linearer Gradient pI 4,8 - 8, Ordinate: nicht linearer Gradient MG 30 - 110 kDa.

7.1.2 Vorüberlegungen zur Auswertung

Interessant waren in dieser Studie in erster Linie weniger die relativen Anteile der Proteine auf den Partikeln, sondern, da sich große Unterschiede in den Gesamtmengen zeigten, vielmehr die absoluten Mengen der einzelnen Proteine. Daß diese absoluten Mengen jeweils eines bestimmten Proteins auf unterschiedlichen Gelen innerhalb eines Laufes auch ohne Einsatz eines Standards verglichen werden konnten, zeigte die exemplarische Überprüfung der Reproduzierbarkeit anhand von mit Poloxamer 235, 238 und 407 überzogenen Partikeln. In drei verschiedenen Läufen (inklusive des präsentierten) lag sowohl die qualitative Reproduzierbarkeit als auch die der prozentualen Anteile für alle drei Partikel in dem in 6.1 angegebenen Rahmen. Zwar waren die absoluten Mengen für ein Partikel auf den Gelen in den drei Läufen leichten Schwankungen unterworfen, die Verhältnisse der absoluten Mengen jeweils eines bestimmten Proteins auf den verschiedenen Partikeln (z.B. Protein XY auf Partikel A / Protein XY Partikel B) war jedoch in jedem der drei Läufe im Rahmen der üblichen Abweichungen gleich. Dies ermöglichte den direkten Vergleich der absoluten Mengen eines bestimmten Proteins (in cpm) auf allen Gelen innerhalb des dargestellten Laufes.

An dieser Stelle soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß ein direkter Vergleich der absoluten Mengen zweier unterschiedlicher Proteine aufgrund unterschiedlicher Färbungseigenschaften nicht vorgenommen werden darf. Ein direkter derartiger Vergleich ist jedoch für die im folgenden anzustellenden Betrachtungen auch gar nicht notwendig. Beachtet werden sollte hier lediglich, daß dies streng genommen auch für die Gesamtmengen der Proteine gilt, da beispielsweise unterschiedliche Zusammensetzungen der Gele bei tatsächlich absolut gleicher Proteinmenge unterschiedliche Gesamtwerte ergeben können, eben aufgrund der möglichen Unterschiede in der Färbungsintensität verschiedener Proteine. Da diese eventuellen Abweichungen jedoch durch die Vielzahl an beteiligten Proteinen nivelliert werden und in vorliegender Studie deutliche Unterschiede in den Gesamtmengen detektiert werden konnten, sei der Vergleich unter obigem Vorbehalt gestattet.

Für das Immunglobulin G wurde im vorangegangenen Kapitel festgestellt, daß eine Adsorption nicht nur während der Inkubation stattfindet, sondern auch während der Waschschrte in der Probenvorbereitung. Dies konnte durch Verwendung eines Puffers statt bidestillierten Wassers verhindert

werden (6.3.3). Da die hier beschriebenen Partikel bezüglich ihrer Proteinadsorption jedoch mit Emulsionen, hergestellt mit den gleichen Block-Copolymeren, und diese wiederum mit Lecithin-Emulsionen (hier nicht gezeigt) verglichen werden sollten, wurde, um die Vergleichbarkeit zu wahren, von der Verwendung eines Puffers abgesehen, da dieser die Emulsionssysteme erheblich hätte beeinträchtigen können. Als eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der IgG-Adsorption während der Plasmaentfernung erwies sich die Filtration (6.3.2). Diese wurde allerdings für den vorliegenden Versuch nicht angewendet, da für den Vergleich der absoluten Proteinmengen eine quantitative Rückgewinnung der Partikel erforderlich war, die zum Zeitpunkt des Experiments für die Filtration noch nicht etabliert war.

Da jedoch lediglich die Adsorptionseigenschaften der unterschiedlichen Oberflächen untersucht werden sollten, ohne daraus Rückschlüsse auf ein *In-vivo*-Verhalten der Partikel ziehen zu wollen, ist hier die eventuelle (zusätzliche) Adsorption des IgG während der Waschschrte ohne weiteres in Kauf zu nehmen, ohne daß sie die vergleichende Bewertung der Adsorptionseigenschaften verfälscht. In diesem Fall konnte das IgG sogar zur Differenzierung zwischen den verschiedenen Oberflächen bezüglich ihrer adsorptionsreduzierenden Eigenschaften verwendet werden.

7.1.3 Qualitative Ergebnisse

Bei Betrachtung der Gele und der absoluten Mengen der Hauptproteine fällt auf, daß sich die Adsorptionsmuster aller modifizierten Partikel deutlich von dem der unmodifizierten Latexpartikel unterschieden. Die geringste qualitative Veränderung im Vergleich zu den PS 200 wiesen noch die mit Poloxamer 238 überzogenen Partikel (PS 200-238) auf, aber nach Paarung der Gele der beiden Partikel beliefen sich auch hier die ungepaarten Spots der PS 200 auf 18,9 %, die der PS 200-238 auf 11,6 %. Dagegen zeigten sich die modifizierten Partikel bei *qualitativer* Betrachtung untereinander ähnlich (siehe insbesondere acide Hälfte der Gele). Die größten Unterschiede zwischen den Poloxamer-überzogenen Partikeln waren zwischen PS 200-238 und PS 200-407 zu finden, wobei auch diese Paarung die qualitative Ähnlichkeit der Gele zeigt: Zwar lag der Gesamtanteil der ungepaarten Spots für PS 200-238 bei 23,5 %. Da aber im Gel der PS 200-407 deutlich weniger Spots für Fibrinogen detektiert wurden und der Anteil der ungepaarten Fibrinogen-Spots im Gel der PS 200-238 dadurch bereits 10,5 % ausmachte, sank der Anteil der ungepaarten Spots nach Abzug

dieses einen Proteins auf 13 %. Darin waren kein Spot über 1 % und drei Spots über 0,5 % enthalten. Für PS 200-407 wurden nur 2,8 % ungepaarte Spots detektiert, was etwas über der Schwankung gleicher Gele liegt. Dies war jedoch nicht auf zusätzliche Proteine zurückzuführen, sondern auf zusätzliche Spots von Proteinen, die auf beiden Gelen in unterschiedlicher Menge vorhanden waren (ähnlich wie oben v.v. durch das Fibrinogen, lediglich in geringerer Ausprägung). Aus qualitativer Sicht kann man demnach sagen, daß alle auf PS 200-407 adsorbierten Proteine auch auf PS 200-238 adsorbiert waren. Ein weiteres Beispiel der Ähnlichkeit der Adsorptionsmuster zeigt der Vergleich von PS 200-235 und PS 200-237: Die Anteile der ungepaarten Spots lagen bei 3,8 % bzw. 5,3 %, wobei auch hier zusätzliche Proteine keine Rolle spielten.

Allerdings muß die Aussagekraft der qualitativen Vergleiche, nur basierend auf den ungepaarten Spots, bei Gelen unterschiedlichen Ursprungs mit Zurückhaltung betrachtet werden. Ungepaarte Spots kommen hier oftmals nicht durch zusätzliche Proteine, sondern durch stark unterschiedliche Mengen desselben Proteins zustande. Dies deutet dann auf größere quantitative Unterschiede hin. Die qualitativen und quantitativen Effekte auf die Zielgröße sind nicht leicht zu trennen. Ein umfassendes Bild für eine sinnvolle Bewertung der Unterschiede ergibt nur die Einbeziehung der quantitativen Werte der Hauptproteine selbst.

7.1.4 Quantitative Ergebnisse

In Tabelle 7.1 /2 sind die absoluten Anteile der wichtigsten Proteine auf den Adsorptionsmustern der unterschiedlich modifizierten Partikel aufgeführt.

Tab. 7.1 /2: Adsorbierte Proteine auf den unmodifizierten und den unterschiedlich modifizierten Nanopartikeln. Es sind die absoluten Mengen in cpm dargestellt. Aufgenommen sind die Proteine, die mindestens auf einem Gel mehr als 1 % der Gesamtmenge ausmachten.

Protein	PS 200	PS 200-184	PS 200-188	PS 200-235	PS 200-237	PS 200-238	PS 200-407	PS 200-908
Fibrinogen	5916	1915	2348	539	634	2914	94	16
IgG*	2322	2545	1007	1243	835	1856	569	118
PLS:6**	706	785	607	840	784	906	789	404
Protein B**	611	261	117	147	89	293	30	2
ApoJ	265	770	456	680	456	843	991	513
U2**	100	117	99	62	118	129	105	13
ApoA-I	83	126	67	177	110	90	118	81
ApoC-III	59	132	211	149	197	207	172	190
ApoA-IV	31	73	50	141	44	38	129	16
Transthyretin	31	49	56	48	57	69	53	24
ApoE	29	18	18	67	45	78	62	27
gesamt	14308	8042	6122	5074	4359	9374	3966	1822

*Da außer IgG keine weiteren Immunglobuline mit einer nennenswerten Menge auf einem der Gele vertreten waren, wurde näherungsweise der Anteil der κ - und λ -Ketten (leichte Ketten) dem IgG zugerechnet.

**PLS:6 und U2 sind bisher noch unidentifizierte Proteine und sind benannt nach Anderson und Anderson (1991) bzw. Golaz et al. (1993), Protein B ist ebenfalls nicht identifiziert und nur in dieser Arbeit so benannt (siehe 6.1).

Durch die *quantitative* Betrachtung ergibt sich denn auch ein anderes Bild. Es waren klare Unterschiede zwischen den Partikeln mit den verschiedenen Überzügen zu verzeichnen, hervorgerufen durch die Tatsache, daß zwar auf den verschiedenen überzogenen Partikeln im wesentlichen die gleichen Proteine, aber in völlig unterschiedlichen Mengen adsorbierten. Da die deutlich unterschiedlichen Mengen eines auf zwei Gelen vorhandenen Proteins erheblich praxisrelevanter als der abstrakte Vergleich ungepaarter

Spots sind, soll sich im folgenden auf die absoluten Mengen konzentriert werden.

Ein Blick auf die Gesamtproteinmengen zeigt, daß eine erhebliche Reduktion der Proteinadsorption gegenüber den unmodifizierten Partikeln durch alle Polymerüberzüge stattfand, dies jedoch in deutlich unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 7.1 /2). Während es sich bei den PS 200-238 "nur" um eine Abnahme auf 65,5 % handelte, gelang durch den Überzug mit Poloxamine 908 eine Verminderung auf 12,7 % der Gesamtmenge der unmodifizierten Partikel. Die Werte für die übrigen Partikel lagen in Abstufungen dazwischen.

Eine noch drastischere Reduktion konnte für das Hauptprotein der unmodifizierten Latexpartikel, das Fibrinogen, nachgewiesen werden (Abb. 7.1 /3). Ebenfalls gab es hier erhebliche Unterschiede zwischen den Überzugsmaterialien: Mit Poloxamine 908 und Poloxamer 407 wurde eine Reduktion des Fibrinogens auf 0,3 bzw. 1,6 % der Menge auf unmodifizierten Partikel erzielt, auf PS 200-238 adsorbierten immerhin noch 49,3 % (Tab. 7.1 /2).

Für IgG bildete PS 200-184 mit einer geringfügigen Zunahme gegenüber den PS 200 eine Ausnahme, ansonsten verringerten sich auch hier die Anteile unterschiedlich stark gegenüber den unmodifizierten Partikeln. Ohne Ausnahme galt dies auch für Protein B, das die höchsten Werte auf PS 200-238 und PS 200-184 besaß. Wie schon für das Fibrinogen wiesen für beide Proteine die PS 200-908 mit Abstand die geringste Menge auf, wiederum jeweils gefolgt von PS 200-407 (Tab. 7.1 /2). Anders sahen die Verhältnisse für das vierte Protein aus, das verstärkt auf den unmodifizierten Latexpartikeln adsorbierte, für das PLS:6. Die Unterschiede waren hier zwischen den verschiedenen Überzügen merklich geringer, die meisten Werte lagen knapp über dem der PS 200. Die geringste Adsorption erzielten jedoch wiederum PS 200-908.

Ganz andere Tendenzen ergaben die Vergleiche der Proteine, die im Adsorptionsmuster der unmodifizierten Partikel einen geringeren Anteil besaßen. So lagen die Mengen der Apolipoproteine J und C-III auf den modifizierten Partikeln jeweils deutlich über denen der PS 200, mit cpm-Werten bis zu 991 gehörte ApoJ auf den modifizierten Partikeln sogar zu den gewichtigeren Proteinen. U2 war auf den meisten Partikeln in ähnlichem Ausmaß vertreten, lediglich PS 200-235 und besonders -908 zeigten niedrigere Werte. Für die Apolipoproteine A-I, A-IV und E und das Transthyretin war meist ein leichter Anstieg gegenüber PS 200 zu

verzeichnen, auffällig waren die verhältnismäßig großen Mengen ApoA-I auf PS 200-235 und ApoA-IV auf PS 200-235 und -407. Allgemein wurde für die Apolipoproteine deutlich, daß sie im Gegensatz zu den oben beschriebenen Proteinen auf den Partikeln PS 200-908 und -407 keine besonders niedrige Adsorption zeigten.

Insgesamt gilt, daß sich für jedes Protein bezüglich der adsorbierten Menge eine unterschiedliche Reihenfolge der modifizierten Partikel ergab.

Es läßt sich als Tendenz festhalten, daß diejenigen Proteine, die in großer Menge auf den unmodifizierten Partikeln adsorbierten (Fibrinogen, IgG, Protein B), auf den überzogenen Partikeln stark reduziert, aber auch mit jeweils deutlichen Unterschieden auf den verschiedenen Partikeln vorlagen. PLS:6 mit etwa gleichbleibender Adsorption, auch gegenüber PS 200, bildete hier eine Ausnahme. Fibrinogen, IgG und PLS:6 lagen aber trotz der Reduktion im Vergleich zu den übrigen Proteinen immer noch in relativ großen Mengen vor, hier mit Ausnahme von PS 200-908 und teilweise von PS 200-407.

Dagegen erreichte von den übrigen Proteinen, die auf den unmodifizierten Partikeln nicht so stark vertreten waren, lediglich ApoJ ähnlich hohe Werte, alle weiteren blieben trotz teilweise erheblicher Steigerung gegenüber PS 200 mit ihren Mengen weit darunter. Die Unterschiede waren hier generell zwischen den einzelnen Überzügen geringer als bei den oben beschriebenen, auf den unmodifizierten Partikeln stärker adsorbierten Proteinen.

7.2 Untersuchung möglicher Korrelationen der Proteinadsorption mit den Oberflächeneigenschaften

7.2.1 Überzugsschichtdicke und Hydrophobie

Als wesentliche Oberflächencharakteristika der mit Poloxameren bzw. Poloxaminen überzogenen Partikel werden häufig die Dicke der Überzugsschicht und die Hydrophobie der Partikel genannt (Müller, 1991). Denkbar wäre, daß mit einer zunehmenden Schichtdicke eine stärkere Abschirmung der Partikel von ihrem umgebenden Medium und im vorliegenden konkreten Fall von potentiell adsorbierenden Proteinen einhergeht. Die Schichtdicken der modifizierten Latexpartikel (PCS-Daten) sind zusammen mit den Gesamtmengen der adsorbierten Proteine und den Mengen des Fibrinogens, des Hauptproteins der unmodifizierten Partikel, in Tab. 7.2 /1 aufgeführt.

Tab. 7.2 /1: Schichtdicken der Polymerüberzüge und Proteinadsorption auf den unterschiedlich modifizierten Partikeln

	Schichtdicke des Überzuges [nm]	Gesamtmenge adsorbierter Proteine [cpm]	Menge des adsorbierten Fibrinogens [cpm]
PS 200-908	8,6	1822	16
PS 200-407	7,4	3966	94
PS 200-188	4,8	6122	2348
PS 200-238	4,7	9374	2914
PS 200-237	4,3	4359	634
PS 200-184	1,5	8042	1915
PS 200-235	1,3	5074	539
PS 200	-	14308	5916

Tatsächlich wurden für die beiden dicksten Überzüge, Poloxamine 908 und Poloxamer 407, auch die geringsten Gesamt- und Fibrinogenadsorptionen gemessen. Der Abstand dieser beiden Polymere zu den übrigen bezüglich der Schichtdicke spiegelt sich insbesondere in den extrem niedrigen Fibrinogenmengen wider. Wie unter 7.1 ausgeführt, galt diese Sonderstellung außerdem für die Proteine IgG und Protein B.

Außer für diese beiden hohen Schichtdicken war aber keine weitere Korrelation möglich. Die PS 200-238 zeigten trotz mittlerer Schichtdicke klar die höchste Gesamt- und Fibrinogenadsorption, wohingegen beispielsweise die PS 200-235 eine sehr dünne Überzugsschicht besaßen, jedoch nur eine vergleichsweise geringe Gesamt- und Fibrinogenadsorption. Die Hydrophobie, gemessen mit hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) von Wesemeyer (1993), ergab eine ähnliche Reihung* der Partikel wie die Schichtdicke :

abnehmende Hydrophobie

PS 200-184 > -235 >> -238 > -188 >> -908 > -407

*(PS 200-237 nicht analysiert)

Lediglich die PS 200-407 bzw. -908 als hydrophilste Partikel stimmten grob mit der Erwartung der niedrigsten Proteinadsorption überein. Als deutlich hydrophober hoben sich die beiden Partikel PS 200-184 und -235 von den übrigen ab, es bestanden aber große Unterschiede bezüglich der Proteinadsorption zwischen den beiden Partikeln. Die PS 200-238 mit ihrer starken Proteinadsorption hatten wiederum eine Mittelstellung auf der

Hydrophobieskala.. Auch hieraus ergab sich somit keine Korrelation mit den adsorbierten Proteinmengen (Tab. 7.2 /1). Auch für alle weiteren Proteine konnte ebenfalls keine den Schichtdicken bzw. Hydrophobien der Partikel entsprechende Reihenfolge ermittelt werden (Tab. 7.1 /2).

7.2.2 Eigenschaften des Polyethylenoxids (PEO) und Struktur der adsorbierten Block-Copolymere

Da pauschale Korrelationen der Proteinadsorption mit den konventionellen Parametern der Schichtdicke und der Hydrophobie nicht möglich sind, müssen die Betrachtungen differenzierter erfolgen. Es soll daher speziell auf das Polyethylenoxid (PEO) und die durch die Überzüge entstehenden Oberflächenstrukturen eingegangen werden, um mögliche Ursachen für die teilweise krassen Unterschiede zwischen den unterschiedlich modifizierten Partikeln abzuleiten. Zusätzlich interessant wäre es, dadurch Hinweise zu erhalten, wo konkret die Proteine adsorbieren, auf der Latexoberfläche oder auf den Polyethylen-/Polypropylenstrukturen des Überzuges.

7.2.2.1 Prinzipien der Reduktion der Proteinadsorption durch PEO

Zunächst werden die Prinzipien, die der allgemein anerkannten niedrigen Proteinadsorption auf mit PEO modifizierten Oberflächen zugrunde liegen, dargestellt. Eine mögliche Komponente ist die extrem niedrige freie Grenzflächenenergie der PEO/Wasser-Grenzfläche. An einer derartigen Grenzfläche wirken auf die Proteine keine treibenden Kräfte für eine Adsorption, die sich von denen der Bulklösung unterscheiden. Daß allerdings andere neutrale, hydrophile Polymere (z.B. Agarose, Dextran, Methylcellulose) ebenfalls eine niedrige freie Grenzflächenenergie besitzen, in ihrer Proteinresistenz jedoch hinter dem PEO zurückbleiben, deutet darauf hin, daß noch weitere Faktoren beteiligt sein müssen (Lee, J.H. et al., 1989). Im Gegensatz zu nahe verwandten Polymeren ist PEO bei Raumtemperatur in allen Verhältnissen mit Wasser mischbar, was daraus resultiert, daß die PEO-Segmente die Lücken in der tetraedrischen Wasserstruktur hervorragend ausfüllen und dadurch dieselbe nur minimal stören. Diese einzigartige Lösungseigenschaft führt zu flüssig-ähnlichen Zuständen der Oberflächen, woraus sich eine hohe Flexibilität oder Mobilität der PEO-Ketten mit minimierter Adsorptionsmöglichkeit ergibt (Lee, J.H. et al., 1989).

Als eine weitere wichtige Ursache der geringen Proteinadsorption wird der Effekt der sterischen Stabilisierung herangezogen, welcher wiederum aus zwei Komponenten besteht. Zum einen kommt es durch ein sich näherndes Protein zu einer Beschränkung des zur Verfügung stehenden Raumes und damit einer Reduzierung der Anzahl möglicher Konformationen der PEO-Kette. Daraus folgt ein Entropieverlust, aus dem sich eine abstoßende Kraft entwickelt. Zum anderen gilt die Theorie des "excluded volumes": Ohne Fremdeinwirkung bindet das PEO-Molekül Wassermoleküle über die Ethergruppen und besitzt eine hohe Entropie. Ab einem bestimmten Molekulargewicht ist eine Faltung auf sich selbst möglich, was einen lockeren Einschluß der gebundenen Wassermoleküle innerhalb der Faltungen ermöglicht. Durch diese Hydrathülle entsteht ein zugangsloser Raum ("excluded volume"), durch den die Proteine abgestoßen werden. Damit ein Protein dieses hydrierte PEO-Knäuel bei Annäherung komprimieren kann, wird Energie benötigt, um die ethergebundenen Wassermoleküle zu lösen, während gleichzeitig die PEO-Kette an Entropie verliert. Obwohl die freiwerdenden Wassermoleküle Entropie gewinnen, führt der Gesamtprozeß zu einer Erhöhung der freien Energie und findet daher nicht spontan statt (Lee, J.H. et al., 1989; Gombotz et al., 1992).

7.2.2.2 Die Proteinadsorptions-Theorie auf PEO-Oberflächen nach Jeon et al.

Die oben dargestellten Überlegungen zeigen zwar die an der geringen Proteinadsorption beteiligten Faktoren, liefern aber noch keine Erklärungen für die unterschiedlichen Adsorptionsmuster auf den Partikeln. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang eine von der Arbeitsgruppe Andrade unter Mitwirkung von de Gennes erarbeitete Theorie, die im ersten Teil die Interaktion eines unendlich großen Proteins durch eine PEO-Oberfläche hindurch mit einem darunterliegenden Substrat beschreibt (Jeon et al., 1991), während der zweite Teil auf die Interaktion von Proteinen mit den PEO-Molekülen in Abhängigkeit von der Proteingröße eingeht (Jeon und Andrade, 1991).

Der erste Teil der Studie basiert auf der Annahme, daß ein hydrophobes Substrat mit endständig gebundenen PEO-Ketten mit einem Protein von unendlicher Größe in Interaktion tritt. Sterische Abstoßung, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Anziehungskräfte werden berechnet als Funktion der Oberflächendichte und Kettenlänge der PEO-Ketten.

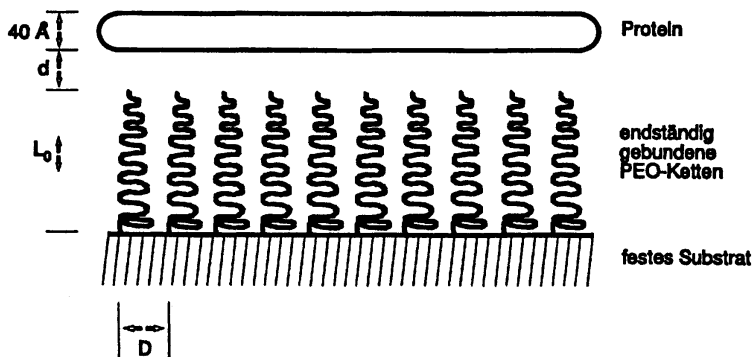


Abb. 7.2 /1: Modell der Adsorption von Proteinen (unendliche Größe, Breite 40 \AA) auf PEO-Oberflächen (PEO-Ketten endständig auf einem festen Substrat gebunden). d = Abstand zwischen PEO-Oberfläche und Protein, L_0 = Schichtdicke der PEO-Ketten im Gleichgewicht (ohne Fremdeinwirkung), D = Abstand zwischen den PEO-Ketten (nach Jeon et al., 1991).

Die hohe Proteinresistenz des PEO selbst wird mit den niedrigen Van-der-Waals-Kräften zwischen PEO und Protein begründet, resultierend aus dem niedrigsten Brechungsindex aller wasserlöslichen synthetischen Polymere und der daraus folgenden hohen statischen Dielektrizitätskonstante.

Wenn nun ein Protein auf eine PEO-Oberfläche trifft und die PEO-Ketten komprimiert werden, sind zwar die Van-der-Waals-Kräfte zwischen Protein und dem unter dem PEO liegenden hydrophoben Substrat vernachlässigbar klein, aber die hydrophobe Interaktion zwischen Protein und Substrat konkurriert mit der sterischen Abstoßung durch die PEO-Ketten. Eine Proteinresistenz des Substrates, hervorgerufen durch die PEO-Ketten, wird durch eine hohe PEO-Oberflächendichte und eine große PEO-Kettenlänge begünstigt. Dabei hat die Oberflächendichte ($\sim D$, Abb. 7.2 /1) einen größeren Effekt als die Kettenlänge (Jeon et al., 1991).

Im zweiten Teil der Theorie werden konkrete Proteingrößen in die Berechnungen einbezogen. Außerdem wird die Annahme gemacht, daß auch PEO-Oberflächen einen, wenn auch geringen, hydrophoben Charakter aufweisen, der hydrophobe Interaktionen zwischen PEO und Protein auslösen kann. Gegenüber der sterischen Abstoßung sind die Van-der-Waals-Kräfte zwischen Protein und PEO erneut zu vernachlässigen. Bei Kompression der PEO-Ketten steigt die Oberflächendichte des PEO

allmählich an, d. h. auch die "Hydrophobie" steigt. Es kann nun für jede Proteingröße eine optimale Oberflächendichte ermittelt werden, die die größtmögliche Proteinresistenz gewährleistet. Tendenziell ist eine relativ hohe Oberflächendichte am günstigsten für eine Resistenz gegenüber kleinen Proteinen, während niedrigere Oberflächendichten günstiger sind gegenüber großen Proteinen. Anzustreben sind auf jeden Fall möglichst lange PEO-Ketten, solange die jeweils optimale Oberflächendichte erhalten bleibt (Jeon und Andrade, 1991).

Die Theorie basiert auf einer Reihe von Annahmen, aber die qualitativen Trends und Schlußfolgerungen sollten Gültigkeit haben. Allein durch die Betrachtung der Proteingröße wird deutlich, daß es nicht überraschend ist, auf derselben durch PEO modifizierten Oberfläche Unterschiede in der Proteinadsorption bzw. -resistenz für verschiedene Proteine zu finden (Andrade et al., 1992). Umgekehrt dürfte für ein Protein durch geringfügige Veränderung der PEO-Strukturen auf der Oberfläche die Adsorptionsneigung stark beeinflußbar sein.

7.2.2.3 Das Poloxamer-Adsorptionsmodell nach Lee und Andrade

Um die dargestellte Theorie auf den vorliegenden Fall anwenden zu können, sind neben der Kettenlänge der PEO-Blöcke Informationen über die Oberflächendichte des PEO nach Adsorption der Block-Copolymere erforderlich.

Die Adsorption der Poloxamere geschieht zunächst aufgrund von Van-der-Waals-Kräften zwischen dem hydrophoben Teil des Tensids (Polypropylenoxid, PPO) und der Partikeloberfläche (exotherm). Besonders ausgeprägt und letztlich ausschlaggebend für die Adsorption ist danach eine endotherme Phase, die durch Wechselwirkungen zwischen den Tensidmolekülen geprägt ist, wobei die treibende Kraft der Entropiegewinn der Wassermoleküle bei Dehydratation der Tenside ist (Wesemeyer, 1993). Auf der Basis ihrer experimentellen Untersuchungen entwickelten Lee und Andrade (1988) ein Modell der Konformationen unterschiedlicher adsorbierter PEO-PPO-PEO-Polymere auf einem hydrophoben Substrat (Abb. 7.2 /2).

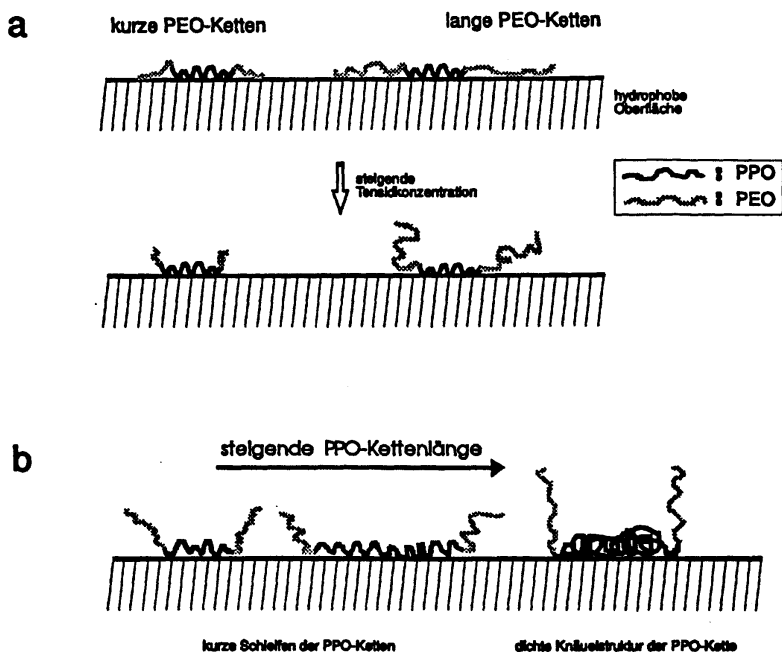


Abb. 7.2 /2: Konformation adsorbierter PEO-PPO-PEO-Block-Copolymere (nach Lee und Andrade, 1988),
a) Einfluß der PEO-Kettenlänge, b) Einfluß der PPO-Kettenlänge.

Bei geringer Tensidkonzentration liegen kürzere PEO-Ketten flach auf der hydrophoben Oberfläche, während längere PEO-Ketten aus Entropiegründen bevorzugt kleine Schleifen bilden (Abb. 7.2 /2a). Wenn die Tensidkonzentration ansteigt, werden die flach liegenden PEO-Ketten von den PPO-Ketten der Nachbarmoleküle verdrängt und ragen ins Dispersionsmedium hinein. Dabei sind die PEO-Ketten jedoch nicht vollständig ausgestreckt, so daß bei steigender PEO-Kettenlänge ein erhöhter Platzbedarf resultiert, der mit einer geringeren Menge adsorbierter Poloxamer-Moleküle pro Flächeneinheit einhergeht (Abb 7.2 /2a).

Kurze PPO-Ketten adsorbieren mit kleinen Schleifen auf der hydrophoben Oberfläche. Mit steigender PPO-Kettenlänge nimmt zunächst auch der auf der Oberfläche eingenommene Raum zu. Bei weiterer Verlängerung der

PPO-Kette ($> 1000 \text{ g/mol}$, $= \sim 17 \text{ PPO-Einheiten}$) beginnt sich die PPO-Struktur auf der Oberfläche aufgrund verstärkter Kohäsionskräfte, d. h. zunehmender hydrophober Interaktion zwischen den seitlichen Methylgruppen, zu knäueln. Daraus ergibt sich ein verringerter Raumbedarf des Moleküls an der Oberfläche. Die Komprimierung des Moleküls durch die lateralen Kräfte, hervorgerufen durch die hydrophobe Interaktion, führt zu einer vertikalen Ausrichtung der PEO-Ketten, die nun stärker ausgestreckt vorliegen (Abb. 7.2 /2b).

Zusammenfassend ergibt sich, daß bei hoher Tensidkonzentration die adsorbierte Menge, und damit die Oberflächendichte, mit steigender PPO-Kettenlänge zunimmt (vorausgesetzt, die PPO-Kette ist ausreichend lang, $> 1000 \text{ g/mol}$) und mit steigender PEO-Kettenlänge abnimmt.

7.2.2.4 Mögliche Korrelationen der Proteinadsorption mit den Oberflächenstrukturen

Bei Betrachtung der absoluten adsorbierten Mengen der einzelnen Proteine auf den unterschiedlich modifizierten Partikeln (Tab. 7.1 /2) fiel auf, daß auf den meisten der Partikel trotz mengenmäßiger Reduktion diejenigen Proteine besonders stark vertreten sind, die auch auf den unmodifizierten Polystyrol-Partikeln die größte Rolle spielen (Fibrinogen, IgG, PLS:6 und z.T. Protein B). Da nach der Theorie von Jeon et al. (1991, s.o.) bei ausreichend geringer Oberflächendichte der PEO-Ketten eine Interaktion der Proteine mit der unter der PEO-Schicht liegenden hydrophoben Oberfläche erwartet wird, kann dies darauf hindeuten, daß eine Adsorption zumindest der genannten Proteine auf der Polystyrol-Oberfläche stattfand. Mit Ausnahme von PLS:6 waren für diese Proteine auch die größten Unterschiede zwischen den modifizierten Partikeln zu beobachten. Die großen Unterschiede werden auf die unterschiedliche Zugänglichkeit der Polystyrol-Oberfläche, hervorgerufen durch verschiedene Block-Copolymer-Konformationen, zurückgeführt.

Eine theoretisch denkbare Desorption der Poloxamere durch die Proteine, wie sie auf anderen Oberflächen (DDS-Glas und LDPE) postuliert wurde (Amiji und Park, 1992), wird als weniger wahrscheinlich erachtet. So konnten Lee et al. (1990) auf LDPE für Copolymere von Alkylmethacrylaten mit Methoxy-(PEO)-methacrylaten keine Hinweise auf eine Desorption durch adsorbierende Proteine finden. Beispielsweise detektierten Gombotz et al. (1991) auf PET-Filmen, auf denen PEO-Ketten kovalent gebunden

waren, auf den Oberflächen mit den längsten PEO-Ketten zwar die niedrigste Adsorption, aber keine vollständige Elimination der Proteinadsorption. Da hier eine Desorption ausgeschlossen war, deutete dies auf eine unvollständige Bedeckung der Oberfläche bzw. auf Regionen geringerer PEO-Dichte hin, in denen eine Proteinadsorption möglich ist.

Im folgenden sollen die - zunächst teilweise paradox anmutenden - Unterschiede zwischen den einzelnen Partikeln näher erörtert werden. Dabei finden die PS 200-235, -238 und -407 besondere Beachtung, da mit ihnen jeweils Paarbildungen untereinander bezüglich der PEO- und PPO-Kettenlängen ihrer Poloxamere möglich sind (Tab. 7.2 /2).

Tab. 7.2 /2: Kettenlängen der Poloxamere, Molekulargewicht und resultierende Schichtdicken.

Poloxamer	PEO-PPO-PEO	MG	Schichtdicke auf PS 200 [nm]
235	27-39-27	4600	1,3
238	97-39-97	10800	4,7
407	98-67-98	11500	7,4

In Tab. 7.2 /3 sind noch einmal die Mengen der oben aufgeführten Proteine mit wahrscheinlicher Adsorption auf Polystyrol aufgeführt.

Tab. 7.2 /3: Vergleich der Proteinadsorption auf PS 200-235, -238 und -407. Aufgeführt sind die Proteine, die auf unmodifizierten Polystyrol-Partikeln die größten Anteile besaßen.

	Fibrinogen	IgG	PLS:6	Protein B
PS 200-235	539	1243	840	147
PS 200-238	2914	1856	906	293
PS 200-407	94	569	789	30

Es erschien zunächst widersinnig, daß auf den PS 200-235 trotz geringeren Molekulargewichts des Poloxamers und nur minimaler Schichtdicke deutlich weniger Proteine adsorbierten als auf den PS 200-238. Letztere besaßen mit 97 EO-Einheiten zudem eine PEO-Kettenlänge, die bereits für eine effektive Reduktion der Proteinadsorption verantwortlich gemacht wurde (Gombotz et al., 1991). Dabei handelte es sich allerdings nicht um Poloxamere, sondern um einzelne PEO-Ketten, die an eine Oberfläche gebunden waren. Da nach Jeon et al. (1991, s. 7.2.2.2) die Interaktionen der Proteine mit dem unter der

PEO-Schicht liegenden Substrat jedoch nicht nur von der PEO-Kettenlänge, sondern stärker noch von der Oberflächendichte des PEO abhängig sind, muß in diesem Fall die Konformation der adsorbierten Poloxamere berücksichtigt werden. Nach Lee und Andrade (1988, s. 7.2.2.3) kommt es bei gleichbleibender PPO-Kettenlänge und steigender PEO-Kettenlänge zu einer geringeren Oberflächendichte. Dies war offensichtlich bei PS 200-238 gegenüber -235 der Fall. Die langen PEO-Ketten lagen nicht ausgestreckt vor, was zusätzlich an der geringeren Schichtdicke gegenüber PS 200-407 sichtbar wurde, und es adsorbierten weniger Poloxamer-Moleküle pro Flächeneinheit als auf den PS 200-235 (s. Abb. 7.2 /2a). Die geringe PEO-Oberflächendichte auf den PS 200-238 war demzufolge für die starke Interaktion der aufgeführten Proteine mit der Polystyrol-Oberfläche und der daraus resultierenden Adsorption verantwortlich. Die relativ niedrige Proteinadsorption trotz der minimalen Schichtdicke auf den PS 200-235 resultierte demnach aus einer verhältnismäßig dichten PEO-Schicht. Dies ist in Übereinstimmung mit Resultaten von Amiji und Park (1992), die ebenfalls zeigten, daß für eine effektive Reduktion der Proteinadsorption mit Poloxameren nicht notwendigerweise lange PEO-Ketten erforderlich sind. Die Unterschiede zwischen den PS 200-238 und -407 werden auf die gleichen Prinzipien zurückgeführt. Bei nahezu gleicher PEO-Kettenlänge kam es auf den PS 200-407 durch die längere PPO-Kette und die daraus resultierenden höheren Kohäsionskräfte zu stärker ausgebildeten Knäuelstrukturen im PPO-Bereich. Die vertikale Streckung der PEO-Ketten war stärker ausgeprägt (Schichtdicke!), und es konnten mehr Moleküle pro Flächeneinheit adsorbieren (s. Abb. 7.2 /2b). Es ergab sich eine hohe PEO-Oberflächendichte, die klar über der der PS 200-238 lag und für die niedrige Proteinadsorption verantwortlich gemacht wird.

Es fällt auf, daß die Unterschiede zwischen den drei Partikeln (gilt auch für *alle* modifizierten Partikel) für die Mengen des Fibrinogens besonders groß waren. Bei Berücksichtigung aller modifizierten Partikel ergab sich als Maß für die Unterschiedlichkeit der adsorbierten Mengen für Fibrinogen nicht nur die größte Spannweite der aufgeführten Proteine, sondern auch der größte Variationskoeffizient (96,4 %). Fibrinogen ist mit einem Molekulargewicht von 330.000 mit Abstand das größte hier aufgeführte Protein. Da es mit einem über 40prozentigen Anteil klar das Hauptprotein auf den unmodifizierten Partikeln war, kann davon ausgegangen werden, daß allgemein bei gegebener Zugänglichkeit der Polystyrol-Oberfläche auch auf modifizierten Partikeln eine präferentielle Adsorption des Fibrinogens stattfindet. Dieses Protein stellt daher auch ein grobes Maß für die Dichte der PEO-Schicht dar, zumindest für das Vorhandensein von großen

"Fehlstellen", durch die eine Interaktion mit der Polystyrol-Oberfläche möglich ist. Dies gilt in geringerem Ausmaß auch für das zweitgrößte betrachtete Protein, das IgG (MG 150.000), wobei hier berücksichtigt werden muß, daß große, auch für Fibrinogen zugängliche "Fehlstellen" aufgrund der höheren Affinität von Fibrinogen besetzt werden. Es kann festgehalten werden, daß die auffallend großen Unterschiede in den Adsorptionsmengen von Fibrinogen, IgG und Protein B wahrscheinlich durch ein Zusammenspiel der Faktoren Affinität zum Substrat (Polystyrol) und Proteingröße hervorgerufen wurden.

Die Studie zeigt aber auch einmal mehr, daß mit einer alleinigen Betrachtung der Fibrinogen-Adsorption, auch bei Adsorption aus Plasma, die Adsorptionseigenschaften von Oberflächen nur verzerrt erfaßt werden. Dies gilt natürlich für die Einzelbetrachtung jedes Proteins. Die Detektion aller adsorbierten Proteine wird oft ein anderes Licht auf die Adsorptionseigenschaften der Oberfläche werfen.

So sind auch für die drei oben herausgestellten Partikel die beschriebenen Prinzipien nur für die Proteine gültig, die eine starke Adsorptionsneigung auf Polystyrol besitzen. Selbst unter diesen bildet das PLS:6 mit den nur geringfügig abweichenden Mengen eine Ausnahme, die ohne weiteres noch nicht erklärt werden kann. Die Mengen der übrigen Proteine unterschieden sich bei weitem nicht so stark auf den verschiedenen Partikeln, teilweise gab es sogar Umkehrungen der Mengenverhältnisse (Tab. 7.1 /2). Bei diesen Proteinen, die eine weitaus schwächere Adsorptionsneigung auf reinem Polystyrol zeigten, wurden allerdings mit Ausnahme von ApoJ jeweils nur geringere Mengen detektiert. Welche Prinzipien der präferentiellen Adsorption dieser Proteine zugrunde lagen und inwieweit eine Interaktion auch mit den PEO-Ketten und/oder den PPO-Ketten beteiligt war, bedarf weiterer Untersuchungen.

Festzuhalten bleibt aber, daß die Adsorption der Hauptproteine (hohes Molekulargewicht!) mit den Konformationen der Poloxamere auf den Partikeln korreliert werden kann. Auch die Beobachtungen der Adsorption auf den übrigen Partikeln stimmen mit den oben beschriebenen Prinzipien überein. So führten beispielsweise im Vergleich von PS 200-188 (PO-Einheiten: 30, EO-Einheiten: 75) mit PS 200-237 (PO: 35, EO: 62) die jeweils kleinen Unterschiede in den Kettenlängen zu einer offensichtlich höheren PEO-Schichtdicke auf den PS 200-237, die insbesondere eine deutlich niedrigere Fibrinogenadsorption nach sich zog (-237: 634 cpm, -188: 2348 cpm). Der Vergleich von PS 200-237 mit -235 erbrachte

insgesamt sehr ähnliche Adsorptionswerte. Die ähnlichen PPO-Kettenlängen führten zu ähnlichen PEO-Oberflächendichten, wobei hier im Gegensatz zum PS 200-238 mit 97 EO-Einheiten sich die 62 EO-Einheiten der PS 200-237 gemäß Lee und Andrade (s. 7.2.2.3) nicht nachteilig auf die PEO-Oberflächendichte auswirkten, andererseits aber auch nur einen geringen Vorteil für die Proteinresistenz trotz der erheblich längeren PEO-Kette gegenüber PS 200-235 (27 EO-Einheiten) bedeuteten.

Interessant ist auch eine weitere Paarung, PS 200-184 und PS 200-188. Die PPO-Ketten sind mit je 30 Einheiten gleich lang, die PEO-Ketten unterscheiden sich jedoch drastisch (-184: 13, -188: 75). Es konnte erwartet werden, daß auf beiden Partikeln die kurze PPO-Kette zu keiner stark ausgeprägten vertikalen Ausrichtung der PEO-Ketten führte, so daß beide Oberflächen gegenüber den meisten der übrigen Partikel eine niedrige PEO-Oberflächendichte aufwiesen. Allerdings adsorbierten wahrscheinlich aufgrund der kleineren PEO-Ketten mehr Moleküle des Poloxamer 184 auf den Partikeln und führten so zu einer dichteren Oberflächenbesetzung als auf den PS 200-188. Demzufolge wurde auch eine geringere Fibrinogenadsorption detektiert. Der Unterschied war jedoch vergleichsweise gering. Im Gegensatz dazu adsorbierte deutlich mehr IgG auf den PS 200-184, und auch die Gesamtproteinmenge war auf diesen Partikeln größer. Hier kam es aller Wahrscheinlichkeit nach zu einer Überlagerung zweier Effekte. Die größere PEO-Oberflächendichte wurde durch die *extrem* kurzen PEO-Ketten überkompensiert, da sie selbst nicht ausreichend war, um eine starke Proteinadsorption zu verhindern.

Eine Sonderstellung bezüglich der Polymerstruktur nehmen die mit Poloxamine 908 überzogenen Partikel ein. Durch die sternförmige Struktur ist ein direkter Vergleich mit den Konformationen der Poloxamere nicht möglich. Jedoch läßt sich feststellen, daß, verglichen mit der Proteinadsorption auf den übrigen Partikeln, offensichtlich mit Poloxamine 908 eine sehr effektive Bedeckung der Polystyrol-Oberfläche erreicht wurde. Die langen PEO-Ketten (121 EO-Einheiten) waren wahrscheinlich ähnlich stark vertikal nach außen gerichtet wie auf den PS 200-407 (Schichtdicke!), eventuell wiederum bedingt durch eine Knäuelstruktur im PPO-Bereich (4 x 16 PO-Einheiten). Diese Konformation und die Präsenz von vier PEO-Ketten pro Molekül resultierten insgesamt in einer hohen PEO-Oberflächendichte. Dies führte zu den jeweils niedrigsten Adsorptionswerten für die vier Hauptproteine der unmodifizierten Polystyrol-Partikel.

Das vorgestellte Experiment zeigt, daß die unterschiedliche Reduktion der Proteinadsorption mit Hilfe von Poloxameren nicht mit simplen Vergleichen der PEO- bzw. PPO-Kettenlängen zu erklären ist, sondern vielmehr daß offenbar die Konformation der Block-Copolymere eine entscheidende Rolle spielt. In der Literatur finden sich mehrere Studien, die nach Bindung von einzelnen PEO-Ketten auf einem hydrophoben Substrat zwar als Gemeinsamkeit eine Abhängigkeit der Proteinadsorption von der PEO-Kettenlänge beschreiben, jedoch deutlich unterschiedliche Kettenlängen für eine effektive Adsorptionsreduktion angeben (Gombotz et al., 1991; Desai und Hubbell, 1991; Bergström et al., 1992). Auch dies deutet auf eine gewichtige Beteiligung der Oberflächenstruktur am Adsorptionsprozeß hin. Wie an den präsentierten Partikeln sichtbar wird, besitzt die Oberflächendichte des Polyethylenoxids großen Einfluß auf die Proteinadsorption.

7.3 Zusammenfassung

Polystyrol-Partikel mit einem Durchmesser von 200 nm (PS 200) wurden mit verschiedenen Block-Copolymeren aus der Reihe der Poloxamere bzw. mit Poloxamine 908 überzogen. Die modifizierten Partikel zeigten alle gegenüber PS 200 eine deutliche Reduktion der Proteinadsorption. Zwar gab es zwischen den Adsorptionsmustern der Partikel keine nennenswerten qualitativen Unterschiede, die durch eventuell neu auftretende Proteine verursacht wurden, aber die quantitative Betrachtung der adsorbierten Proteine erbrachte große Unterschiede zwischen den Überzügen. Zwischen Proteinadsorption und Schichtdicke der Überzüge bzw. Hydrophobie der Partikel war keine allgemeingültige Korrelation möglich. Hingegen konnten die deutlichen quantitativen Unterschiede des Fibrinogen, IgG und Protein B (dominierende Proteine auf den unmodifizierten Partikeln) in Übereinstimmung mit der Proteinadsorptionstheorie nach Jeon et al. (1991) und dem Poloxamer-Adsorptionsmodell nach Lee und Andrade (1988) auf die Struktur der Polyethylenoxid(PEO)-Oberflächen zurückgeführt werden. Für eine Reduktion der Proteinadsorption war in erster Linie eine hohe PEO-Oberflächendichte erforderlich, wobei hinzukommende lange PEO-Ketten den größten Effekt hatten. Die geringste Proteinadsorption zeigten demzufolge PS 200-908 und -407. Die genannten Proteine wiesen gegenüber den anderen, auf Polystyrol nicht so stark adsorbierten Proteinen deutlich größere Unterschiede zwischen den verschiedenen Überzügen auf. Dies wird mit der Affinität zum Substrat und,

bedingt durch die unterschiedliche Zugänglichkeit der Polystyrol-Oberflächen, der Proteingröße begründet. Die Adsorptionsprinzipien der anderen Proteine, die keine derartigen großen Unterschiede zeigten, bedürfen weiterer Untersuchungen, auch unter Berücksichtigung eventueller Beteiligung der PEO-Ketten selbst am Adsorptionsprozeß.

Durch die detaillierte Aufklärung der Adsorptionsmuster konnten erste Korrelationen mit den Oberflächeneigenschaften der modifizierten Nanopartikel vorgenommen und die theoretischen Konzepte der Proteinadsorption auf PEO-Oberflächen im praktischen Experiment bestätigt werden. Die Ergebnisse weisen auf die PEO-Oberflächendichte zusammen mit der PEO-Kettenlänge als ausschlaggebende Faktoren für eine effektive Proteinresistenz.

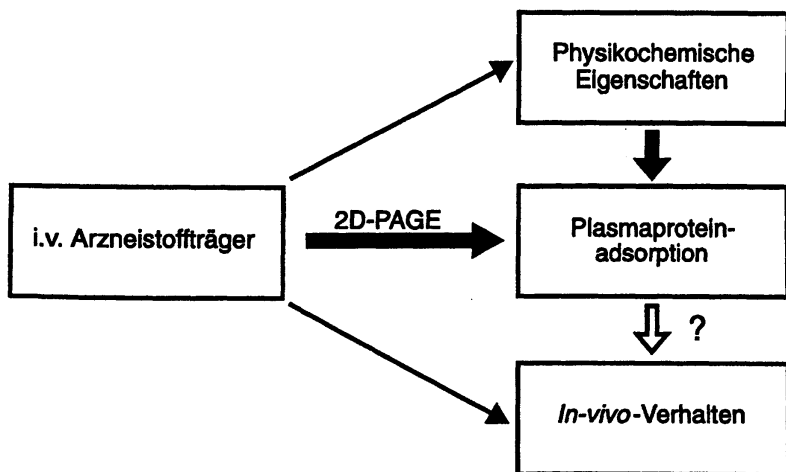


Abb. 7.3 /1: Die detektierten Proteinadsorptionsmuster werden in Übereinstimmung mit der Theorie von Jeon et al. (1991) und dem Block-Copolymer-Adsorptionsmodell nach Lee und Andrade (1988) auf die Struktur der Polyethylenoxid(PEO)-Oberflächen zurückgeführt, wobei insbesondere die PEO-Oberflächendichte und außerdem die PEO-Kettenlänge wichtige Einflußgrößen sind. Dies stellt den Beginn einer Korrelation der Proteinadsorption mit den Oberflächeneigenschaften der Partikel dar.

8 Proteinadsorptionskinetik

Nachdem die routinemäßige Analytik etabliert und die ersten Korrelationen zu den Oberflächencharakteristika der Nanopartikel hergestellt worden waren, sollte der Einfluß der Inkubationszeit untersucht werden, um Erkenntnisse über die Kinetik der Proteinadsorption zu gewinnen. Vroman zog aus seinen Arbeiten den Schluß, daß es auf vielen Oberflächen eine Sequenz adsorbierender Proteine gibt, im Laufe derer höher konzentrierte Proteine durch niedriger konzentrierte, aber letztlich stärker affine Proteine verdrängt werden (Vroman et al., 1980; Vroman und Adams, 1986). Dieses Phänomen ist besonders stark ausgeprägt im Subsekundenbereich, was mit den bekannten Analysemethoden kaum zu detektieren ist. Ergebnisse aus Experimenten mit stark verdünntem Plasma lassen Rückschlüsse auf die adsorbierten Proteine nach extrem kurzen Zeiten zu, die in einer Analytik in Vollplasma nicht zu erfassen sind (Brash, 1987). Auf diese Weise konnte bereits in 6.4.3 der "Vroman-Effekt" in Form von nur kurzfristiger Albumin- und Fibrinogenadsorption nachgewiesen werden. Da für das *In-vivo*-Verhalten von Nanopartikeln eine Änderung der Adsorptionsmuster im Minutenbereich von hoher Relevanz sein dürfte, soll im folgenden die Adsorptionskinetik in diesem Zeitrahmen dargestellt werden.

8.1 Adsorptionskinetik auf oberflächenmodifizierten Nanopartikeln

Die Proben wurden nach der Inkubation filtriert, um längerdauernde Zentrifugationsschritte zu eliminieren, damit erste Werte bereits nach einer halben Minute Inkubationszeit erhalten werden konnten. Beispielfhaft wurden Nanopartikel mit einem Durchmesser von 1000 nm verwendet, die ohne Zeitverlust problemlos mit einem 0,45 µm Celluloseacetat-Filter abgetrennt werden konnten. Testversuche hatten gezeigt, daß durch die Filtration das Adsorptionsmuster, etwa durch Proteinadsorption auf dem Filter, nicht verändert wurde (6.3.2). Die Partikel waren mit Poloxamer 407 modifiziert (PS 1000-407), um die Adsorptionskinetik von vornherein auf Partikeln mit effektiver PEO-Oberfläche, d. h. relativ niedriger dauerhafter Proteinadsorption, zu untersuchen (Kap. 7).

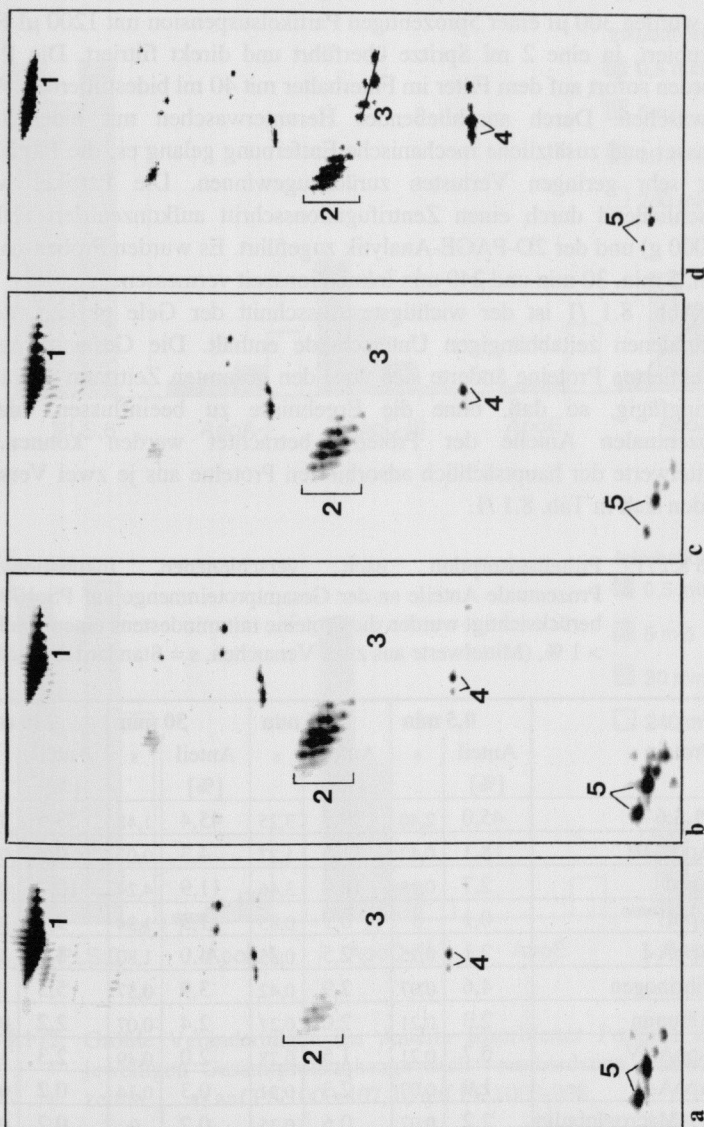


Abb 8.1 /1: Proteinadsorptionsmuster nach verschiedenen Inkubationszeiten auf PS 1000-407 (Querformat !)
 Inkubationszeit: a) 0,5 min, b) 5 min, c) 30 min, d) 240 min.
 (1) PLS:6, (2) ApoJ, (3) ApoE, (4) ApoA-I, (5) ApoC-III.
 Abszisse: pI 4,4 - 6,0, nicht linearer Gradient, Ordinate: MG 6 - 110 kDa, nicht linearer Gradient.

Es wurden 300 µl einer 5prozentigen Partikelsuspension mit 1200 µl Plasma inkubiert, in eine 2 ml Spritze überführt und direkt filtriert. Die Partikel wurden sofort auf dem Filter im Filterhalter mit 40 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Durch anschließendes Herunterwaschen mit bidestilliertem Wasser und zusätzliche mechanische Entfernung gelang es, die Partikel mit nur sehr geringen Verlusten zurückzugewinnen. Die Partikel wurden anschließend durch einen Zentrifugationsschritt aufkonzentriert (10 min, 15000 g) und der 2D-PAGE-Analytik zugeführt. Es wurden Proben nach 0,5 min, 5 min, 30 min und 240 min Inkubationszeit vermessen.

In Abb. 8.1 /1 ist der wichtigste Ausschnitt der Gele gezeigt, der die gefundenen zeitabhängigen Unterschiede enthält. Die Gesamtmenge der detektierten Proteine änderte sich über den gesamten Zeitraum nur äußerst geringfügig, so daß, ohne die Ergebnisse zu beeinflussen, hier die prozentualen Anteile der Proteine betrachtet werden können. Die Mittelwerte der hauptsächlich adsorbierten Proteine aus je zwei Versuchen finden sich in Tab. 8.1 /1.

Tab 8.1 /1: Proteinadsorption nach verschiedenen Inkubationszeiten. Prozentuale Anteile an der Gesamtproteinmenge auf PS 1000-407, berücksichtigt wurden die Proteine mit mindestens einem Meßpunkt > 1 %, (Mittelwerte aus zwei Versuchen, s = Standardabweichung).

Protein	0,5 min		5 min		30 min		240 min	
	Anteil [%]	s	Anteil [%]	s	Anteil [%]	s	Anteil [%]	s
PLS:6	45,0	2,40	39,7	3,25	45,4	1,48	33,5	3,54
ApoC-III	18,1	0,42	11,5	1,27	4,3	0,07	0,8	0,71
ApoJ	2,7	0,28	16,0	3,46	11,9	4,24	10,7	0,14
ApoE	0,1	0	0,9	0,85	1,5	1,34	9,1	3,25
ApoA-I	2,1	0,35	2,5	0,85	4,0	1,80	8,5	4,31
Fibrinogen	4,6	0,07	2,9	0,42	3,9	0,57	5,5	1,84
Albumin	2,3	0,21	2,0	0,21	2,4	0,07	2,2	0,42
ApoA-IV	0,7	0,21	1,5	0,28	2,0	0,49	2,3	1,20
ApoA-II	1,9	0,07	2,3	0,21	0,3	0,14	0,2	0,21
α2-Macroglobulin	2,2	0,07	0,6	0,35	0,2	0	0,2	0,14
Actin	1,1	0,64	1,0	0,78	1,2	0,35	1,8	0,21

Die Proteine mit den größten Anteilen waren auch gleichzeitig die mit den größten Veränderungen. Für sie sind die Veränderungen mit der Zeit in Abb. 8.1 /2a noch einmal anschaulicher dargestellt.

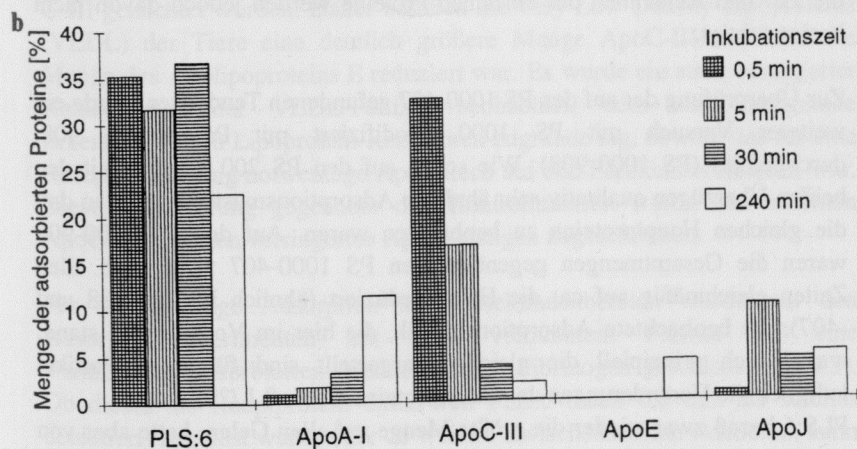
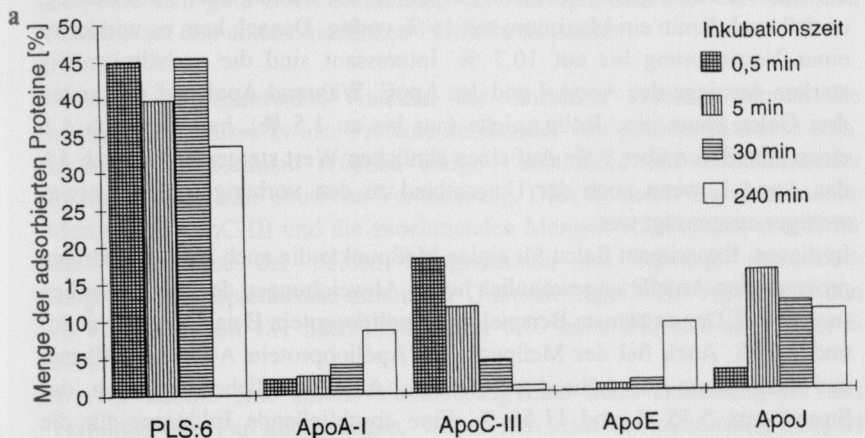


Abb. 8.1 /2: Größte Veränderungen der Anteile adsorbierter Proteine an der jeweiligen Gesamtproteinmenge nach verschiedenen Inkubationszeiten, a) auf PS 1000-407, b) auf PS 1000-908.

Das dominierende Protein des Adsorptionsmusters war über den gesamten Versuchszeitraum eindeutig PLS:6, wobei der Anteil allerdings von 45 % (noch nach 30 min) auf 33,5 % nach 4 h zurückging. Die stärksten relativen Veränderungen zeigten die Apolipoproteine. ApoC-III nahm von 18,1 % nach 0,5 min auf unter 1 % nach 4 h besonders drastisch ab. ApoJ hatte nach

0,5 min nur einen geringen Anteil von 2,7 %, der danach aber stark anstieg, so daß nach 5 min ein Maximum mit 16 % vorlag. Danach kam es wieder zu einer Verringerung bis auf 10,7 %. Interessant sind die verhältnismäßig starken Anstiege des ApoA-I und des ApoE. Während ApoE auf den ersten drei Gelen kaum eine Rolle spielte (nur bis zu 1,5 %), hatte es nach 4 h einen Anteil von über 9 %. Auf einen ähnlichen Wert steigerte sich nach 4 h das ApoA-I, wenn auch der Unterschied zu den vorherigen Gelen etwas weniger ausgeprägt war.

In diesem Experiment fielen für einige Meßpunkte die auch für die niedrigen prozentualen Anteile ungewöhnlich hohen Abweichungen der beiden Proben ($n = 2$) auf. Das extremste Beispiel war Apolipoprotein E nach 5 min mit 0,3 und 1,5 %. Auch fiel der Meßpunkt für Apolipoprotein A-I nach 240 min aus dem sonst für höhere prozentuale Anteile üblichen Rahmen der Streuungen: 5,45 % und 11,55 %. Eine abschließende Erklärung für die überraschende Häufung der relativ hohen Streuungen kann zwar zu diesem Zeitpunkt noch nicht gegeben werden, die gewonnenen Erkenntnisse über die Zu- und Abnahmen der einzelnen Proteine werden jedoch davon nicht beeinträchtigt.

Zur Überprüfung der auf den PS 1000-407 gefundenen Tendenzen wurde ein weiterer Versuch mit PS 1000, modifiziert mit Poloxamine 908, durchgeführt (PS 1000-908). Wie schon auf den PS 200 wurden mit den beiden Überzügen qualitativ sehr ähnliche Adsorptionsmuster erzielt, so daß die gleichen Hauptproteine zu beobachten waren. Auf den PS 1000-908 waren die Gesamtmengen gegenüber den PS 1000-407 zwar nach allen Zeiten gleichmäßig auf ca. die Hälfte reduziert (ähnlich PS 200-908 und -407), die beobachtete Adsorptionskinetik, die hier im Vordergrund stand, war jedoch prinzipiell die gleiche. Dargestellt sind für diese Partikel lediglich die Veränderungen der Hauptproteine (Abb. 8.1 /2b).

PLS:6 besaß zwar wieder die größte Menge auf allen Gelen, hatte aber von vornherein einen nicht ganz so großen Anteil wie auf PS 1000-407. Dennoch war auch hier eine deutliche Abnahme in der gleichen Größenordnung zwischen dem dritten und vierten Gel zu verzeichnen (von 36,7 % auf 22,5 %). Wiederum extrem, sogar noch drastischer als auf den PS 1000-407, verlief der Rückgang des ApoC-III, diesmal von 32,5 % nach 0,5 min auf unter 2 % nach 4 h. ApoJ hatte erneut sein Maximum nach 5 min, während ApoA-I nach langsamem Anstieg den höchsten Wert nach 4 h erreichte. Apo E wurde auf diesen Partikeln nach den ersten drei Inkubationszeiten überhaupt nicht detektiert, kam aber nach 4 h immerhin auf 4,2 %, was die späte verstärkte Adsorption auf den PS 1000-407 bestätigte. Insgesamt läßt

sich eine sehr gute Übereinstimmung der Adsorptionskinetik der einzelnen Proteine auf den unterschiedlichen Partikeln feststellen.

Neben den prozentualen Anteilen der einzelnen Proteine können die Mengenverhältnisse zweier Proteine zueinander von großem Interesse sein. In obigem Experiment erfahren einige Verhältnisse mit fortschreitender Inkubationszeit eine deutliche Veränderung. Dies ist durch die abnehmende Menge des ApoC-III und die zunehmenden Mengen von ApoA-I und E für die Verhältnisse der beiden letztgenannten mit ApoC-III besonders ausgeprägt. Beispielsweise nimmt der Quotient (ApoC-III / ApoE) auf den PS 1000-407 von 181 nach 0,5 min auf 0,09 nach 240 min ab (Faktor > 2000!).

In vivo könnte eine solche Veränderung eine hohe Bedeutung für das Verhalten der Partikel erlangen, wobei nur kurz ein mögliches Beispiel dargestellt werden soll. Aalto-Setälä et al. (1992) beschrieben eine Studie, in der Mäusestämme mit stark überhöhter Expressionsrate für Apolipoprotein C-III gezüchtet wurden. Daher besaßen die *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL) der Tiere eine deutlich größere Menge ApoC-III, während die Menge des Apolipoproteins E reduziert war. Es wurde ein stark verzögerter Katabolismus der VLDL-Partikel beobachtet, dem eine mangelnde Erkennung durch Lipoprotein-Rezeptoren zugrunde lag, obwohl das für eine Rezeptor-Bindung notwendige ApoE noch auf den Partikeln vorhanden war. Diese Veränderung gegenüber den Kontrollmäusen wurde den erhöhten ApoC-III- und den verringerten ApoE-Mengen zugeschrieben.

Für die flüchtige Adsorption im Subsekundenbereich wurde aus den Adsorptionsexperimenten mit stark verdünntem Plasma auf eine Verdrängung adsorbierten Albumins durch Fibrinogen geschlossen (6.4.3). Ob dieses als Hauptprotein direkt von PLS:6 (nach 0,5 min als solches detektiert) abgelöst wurde oder ob weitere Zwischenschritte existieren, kann noch nicht abschließend beantwortet werden. Für die Sequenz dieser Proteine gilt jedenfalls die oben angesprochene abnehmende Konzentration im Plasma, so daß hier tatsächlich höher konzentrierte Proteine von geringer konzentrierten verdrängt wurden (Konzentration im Plasma: Albumin: 3500-5000 mg / 100 ml, Fibrinogen: 200-450 mg / 100ml (Putnam, 1984b), PLS:6: nicht exakt bekannt, aber deutlich geringer als Fibrinogen). Dies galt für die Veränderungen im Zeitrahmen des obigen Experiments nicht mehr uneingeschränkt. Dem stark abnehmenden Anteil des ApoC-III stand eine geringe Plasmakonzentration (12-14 mg / 100 ml) gegenüber, während

ApoA-I mit einer Plasmakonzentration von 100-200 mg / 100 ml (Scanu, 1987) noch ständig zunahm.

Es ist bis jetzt ungeklärt, welche Prinzipien im Einzelfall der Verdrängung adsorbierter Proteine durch andere zugrunde liegen. Neben der Konzentration, die insbesondere zu Beginn des Adsorptionsprozesses eine Rolle zu spielen scheint, sind u.a. die Affinität der Proteine, benötigte Aktivierungsenergie, mögliche Konformationsänderungen adsorbierter Proteine und Interaktionen in der adsorbierten Proteinschicht zu beachten (3.1). Die Komplexität der Vorgänge macht genaue Vorhersagen bis heute unmöglich, so daß Experimente wie das hier dargestellte vorerst die einzige Zugangsmöglichkeit zur Aufklärung der Adsorptionssequenzen bleiben.

8.2 Zusammenfassung

Auf Polystyrol-Partikeln mit 1000 nm Durchmesser, modifiziert mit Poloxamer 407 bzw. Poloxamine 908, wurde über einen Inkubationszeitraum von 0,5 - 240 min ein sich veränderndes Adsorptionsmuster ermittelt. Dabei zeigten auf beiden Partikeln die Mengen der Hauptproteine PLS:6, ApoA-I, ApoC-III, ApoE und ApoJ die deutlichsten Veränderungen, wobei besonders die starke Abnahme von ApoC-III einerseits und die Zunahmen von ApoE und A-I andererseits zu drastischen kontinuierlichen Änderungen der Quotienten aus den Mengen dieser Proteine führte. Eine mögliche Relevanz für das *In-vivo*-Verhalten der Partikel wurde dargestellt.

Im Gegensatz zu der schon vorher ermittelten Adsorption im Subsekundenbereich (Sequenz Albumin-Fibrinogen-PLS:6) konnte gezeigt werden, daß im hier vermessenen Zeitrahmen kein direkter Zusammenhang zwischen der Plasmakonzentration und der Adsorptionssequenz bestand.

9 60 nm Polystyrol-Partikel - eine Annäherung an die kontrollierte Arznei- stoffabgabe und das Drug Targeting

Ein Beweggrund für den Beginn des in dieser Arbeit dargestellten Projektes war das *In-vivo*-Verhalten der 60 nm Polystyrol-Partikel, modifiziert mit Poloxamine 908 bzw. Poloxamer 407, in den Studien von Illum et al (1987) und Illum und Davis (1987). Im Kaninchenmodell wurde mit Partikeln, die mit Poloxamine 908 überzogenen waren, eine Zirkulation im Blutkreislauf erreicht, mit Poloxamer 407 modifizierte Partikel wurden verstärkt in die Endothelzellen des Knochenmarks aufgenommen. Trotz intensiver physikochemischer Charakterisierung der Partikel konnte bislang keine Ursache für das unterschiedliche Verhalten ermittelt werden (siehe auch 2.3). Die geringen Unterschiede, die durch Messung der Überzugsschichtdicke (PCS), der Oberflächenhydrophobie (HIC), der Oberflächenladung und der Ladung in Serum (als grobes Maß für die Proteinadsorption) (LDA) festgestellt wurden, führten zu keiner aussagekräftigen Differenzierung der Partikel (Müller, 1991).

Die wahrscheinliche Relevanz der Plasmaproteine für das *In-vivo*-Verhalten ist bereits in Abschnitt 2.4 dargestellt worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten eventuelle Unterschiede in der Proteinadsorption auf den beiden Partikeln aufgeklärt werden.

9.1 Das Separationsproblem

9.1.1 Filtration und Zentrifugation

Die Polystyrol-Partikel unterschieden sich mit einem Durchmesser von 60 nm von allen bisher untersuchten Partikeln in ihrer Trennbarkeit vom Plasma nach Inkubation. Eine statische Filtration erwies sich aufgrund der Verstopfung der einzusetzenden Filter (Porengröße < 50 nm), auch bei Verwendung einer Rührzelle, als unpraktikabel. Eine weitere Möglichkeit, die Cross-Flow-Filtration, stand zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht zur Verfügung. Sie zeichnet sich dadurch aus, daß die Suspension die Filtermembran parallel überströmt, während die Filtrationsrichtung senkrecht dazu steht, was dem Aufbau eines Filterkuchens entgegenwirkt. Allgemein ist bei Einsatz einer Filtration durch derart geringe Porengrößen jedoch ohnehin mit einer Rückhaltung von freien Plasmaproteinen zu rechnen, so

daß eventuelle Verfälschungen des Adsorptionsmusters hätten berücksichtigt werden müssen, was die Filtration von vornherein als Mittel der zweiten Wahl erscheinen ließ.

Allerdings erwies sich auch die Zentrifugation als nicht so problemlos durchführbar wie bei den bisher bearbeiteten Partikeln. Da die zur Verfügung stehenden Zentrifugen mit dem Rotor für Eppendorfgefäße mit bis zu 25000 g arbeiteten und die ermittelten Adsorptionsmuster bei einer derartigen mechanischen Belastung keine Veränderungen gezeigt hatten (6.3.1), wurde diese Beschleunigung gewählt. Aufgrund der geringen Masse der kleinen Teilchen waren die Fallzeiten im Eppendorf-Gefäß dennoch um ein vielfaches verlängert. Nach Berechnung der Oberflächen wurden als Äquivalent zu den Flächen der PS 200 jeweils 200 µl einer 2,5prozentigen Suspension eingesetzt (siehe auch 9.2) und in 2200 µl Plasma 5 min inkubiert. Die 2400 µl pro Probe wurden in sechs Eppendorfgefäße á 400 µl aufgeteilt, um die Fallstrecken für die Teilchen zu verringern. Nach einer Zentrifugationszeit von 7 h (gegenüber sonst maximal 1 h) hatte sich ein deutliches Sediment gebildet, das jedoch im Gegensatz zu den festen, weißlichen Sedimenten der größeren Partikel einen durchscheinenden, lockeren Aufbau besaß, der sich auch bei noch weiter verlängerten Zentrifugationszeiten nicht entscheidend komprimieren ließ. Das Erscheinungsbild des Sediments führte dazu, daß eine klare Trennungslinie zum Plasma nicht gezogen werden konnte, wodurch beim Abpipettieren des Plasmas Partikelverluste in Kauf genommen werden mußten. Die weiteren Zentrifugationsschritte nach Ersetzen des Plasmas durch bidestilliertes Wasser (1000 µl pro Gefäß) benötigten aufgrund der geringeren Dichte des Wassers deutlich weniger Zeit; es wurde 4 x 2,5 h zentrifugiert. Nach der dritten Zentrifugation wurde nach Resuspendierung der Partikel der Inhalt von jeweils zwei Eppendorfgefäßen vereinigt, so daß drei Gefäße pro Probe verblieben (siehe auch 9.1.2).

9.1.2 Der Plasmapellet

Im Laufe mehrerer Versuchsreihen mit 60 nm Partikeln, die mit Poloxamer 407 überzogen waren (PS 60-407), wurden auf den Gelen zunächst einerseits mehrere Apolipoproteine und andererseits eine Reihe von weiteren Proteinen detektiert, von denen das Immunglobulin M die stärkste Fraktion bildete (daneben u.a. IgD, IgG und geringe Mengen Fibrinogen und Albumin). Die Trennung in diese beiden Gruppen wurde vollzogen, da die Apolipoproteine im Rahmen der üblichen Streuungen untereinander stets

gleiche Verhältnisse ihrer Mengen aufwiesen, die Mengen der anderen Proteine einzeln betrachtet und im Verhältnis zu den Apolipoproteinen jedoch deutlich stärkeren Streuungen unterlagen.

Zur gleichen Zeit wurde eine zuerst irritierende, dann aber höchst bedeutsame Beobachtung gemacht. In einem anderen Experiment mit Polystyrol-Partikeln mit einem Durchmesser von 480 nm wurde in einer Probe beim Abpipettieren nach der ersten Zentrifugation irrtümlich etwas Plasma belassen. Zusätzlich zu den üblicherweise auftretenden Proteinen (6.3.1) wurden für diese Probe die gleichen Proteine detektiert, die neben den Apolipoproteinen in der Probe der PS 60-407 auftraten (hauptsächlich IgM, s.o.). Dies war vorerst nicht zu erklären, konnte aber in weiteren Proben durch absichtliches Belassen von 20 µl Flüssigkeit nach jedem Zentrifugationsschritt noch verstärkt werden. Schließlich wurde als eine Probe Plasma ohne jegliche Partikelinkubation zentrifugiert, wobei nach jedem Schritt gezielt eine konstante Menge Plasma im Eppendorfgefäß belassen wurde. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt zeigte sich ein kaum wahrnehmbarer Pellet am Boden des Gefäßes, der ab dem zweiten Schritt aufgrund der nun fast klaren Flüssigkeit deutlicher zu sehen war. Nach Solubilisierung und Analytik dieses Pellets zeigten sich wiederum die gleichen oben bezeichneten Proteine. Es kam demnach zu einer Präzipitation von bestimmten Plasmaproteinen nach Zentrifugation, die durch Verdünnung des Plasmas noch stärker auftrat. Voraussetzung für eine Detektion dieser "Plasmapellet"-Proteine war eine ausreichende Menge, d. h. das Phänomen trat nur in Proben auf, in denen eine hierfür ausreichende Plasmamenge nach dem Abpipettieren verblieb.

Bis jetzt ist nicht abschließend geklärt, wodurch diese Präzipitation hervorgerufen wurde. Eine mögliche Erklärung liefern Horbett und Brash (1987), die Experimente von Asakura beschreiben, in denen in Lösungen der Hämoglobin-Variante S nach mechanischer Belastung (Schütteln) ebenfalls Präzipitate beobachtet wurden. Diese wurden auf eine Denaturierung an der Luft/Wasser-Oberfläche zurückgeführt. Gleiches geschah eventuell in oben beschriebenen Experimenten durch die Zentrifugation. Da dies, wie die Adsorption auf festen Oberflächen, eine bestimmte Oberflächenaktivität der Proteine voraussetzt, stellt die Ermittlung der Ursache der Präferenz der beschriebenen Proteine eine weitere interessante Aufgabe dar.

Hier jedoch war die Erforschung der Adsorptionsmuster auf den 60 nm Partikeln die vorrangige Aufgabe. Durch den lockeren Aufbau des Sediments kam es bei diesen Partikeln beim Abpipettieren des Überstandes nach den Zentrifugationsschritten zwangsläufig zum Verbleib von einer größeren Menge Flüssigkeit in den Partikelzwischenräumen und somit in der

Probe. Die Entstehung des Plasmapellets war also nicht zu vermeiden. Aber gerade das Erscheinungsbild des Partikelsediments, das, wie oben beschrieben, für die Abtrennung vom Plasma nachteilig war, ermöglichte die Lösung des Problems. Bei sehr genauer Betrachtung konnte nämlich in dem lockeren Gefüge des Partikelsediments der Plasmapellet tatsächlich ausgemacht werden. Dies war bei dem festen, weißlichen Sediment der größeren Partikel, wie in dem oben beschriebenen Versuch mit den PS 480, nicht möglich. In den Experimenten mit den PS 60 lag der Pellet relativ fest auf dem Boden des Gefäßes, darüber befanden sich die sedimentierten Partikel. Diese unscheinbare Trennung war vor der Entdeckung der Existenz des Plasmapellets nicht weiter aufgefallen. Nun bot sich aber die Möglichkeit, nach dem vierten und fünften Zentrifugationsschritt (noch drei Gefäße pro Probe) nach Abpipettieren des Überstandes das lockere Partikelsediment abzusaugen und in ein neues Eppendorfgefäß zu überführen. Der Plasmapellet verblieb jeweils am Boden des ursprünglichen Gefäßes und wurde verworfen. Nach dem Abpipettieren des Überstandes nach der fünften Zentrifugation fand für jede Probe die Vereinigung der Partikel aus den drei Gefäßen statt.

Bei diesem rein visuellen Verfahren der Abtrennung war es zwangsläufig, daß die Trennung nicht hundertprozentig möglich war. So wurden beim Absaugen der Partikel in den meisten Fällen winzige Mengen des Plasmapellets mitgenommen, die damit auch zur Analytik gelangten. Dennoch war auf den resultierenden Gelen ein sehr deutlicher Rückgang der Proteine des Plasmapellets gegenüber den Apolipoproteinen zu verzeichnen. In der Abb. 9.1 /1 ist insbesondere das Verhältnis des IgM zu Apolipoprotein A-IV zu betrachten. In diesem Beispiel betrug der Quotient Menge ApoA-IV / Menge IgM μ ohne Abtrennung des Plasmapellets (oben) 0,95, nach Abtrennung des Plasmapellets 102,4. Die Anteile des IgM μ auf dem Gel wurden in den meisten Proben nach Abtrennung des Plasmapellets von > 25 % auf < 0,5 % verringert. Die geringe verbliebene Menge des IgM ist mit höchster Wahrscheinlichkeit auf Verunreinigung des Partikelsediments mit Restmengen des Plasmapellets zurückzuführen. Es wird davon ausgegangen, daß kein IgM auf den 60 nm Partikeln adsorbierte. Die übrigen Proteine des Plasmapellets wurden nach Abtrennung gar nicht mehr detektiert, so daß auch sie nicht zum Adsorptionsmuster der 60 nm Partikel gehörten. Dabei gab es eine Ausnahme, das IgG. Hier gingen die Mengen gegenüber den Apolipoproteinen zwar auch deutlich zurück, jedoch erschien noch eine Restmenge auf dem Gel, die im Gegensatz zum Gel vor Abtrennung des Plasmapellets deutlich über der des IgM lag (Abb. 9.1 /1), aber relativ großen Steuungen unterworfen war.

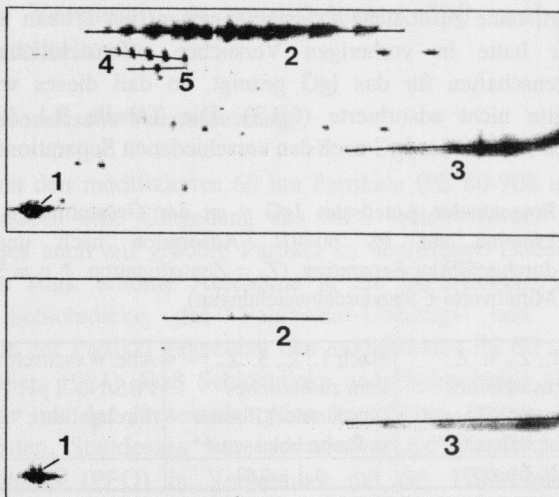


Abb. 9.1 /1: Ausschnitt der detektierten Proteine in Proben von PS 60-407:
oben: ohne Abtrennung des Plasmapellets,
unten: nach Abtrennung des Plasmapellets.
(1) ApoA-IV, (2) IgM μ , (3) IgG γ , (4) IgD δ , (5) Albumin.

9.1.3 Immunglobulin G

Im Abschnitt 6.3 wurde dargestellt, daß das IgG auf manchen Partikeln erst während der Waschschrte zwischen den Zentrifugationen, d. h. aus stark verdünntem Plasma, auf den Partikeln adsorbierte. Da für die 60 nm Partikel aufgrund der *In-vivo*-Relevanz jedoch die tatsächliche Adsorption aus Vollplasma bestimmt werden sollte, mußte hier ermittelt werden, ob das IgG tatsächlich zum eigentlichen Adsorptionsmuster gehörte oder ob es erst nachträglich aus verdünntem Plasma adsorbierte.

Zu diesem Zweck wurden nach den ersten drei Zentrifugationsschritten zusätzlich zum lockeren Sediment und dem darin ohnehin enthaltenen freien Plasma (siehe 9.1.2) jeweils 20 μ l (verdünntes) Plasma in der Probe belassen, bevor mit bidestilliertem Wasser resuspendiert wurde. Der Plasmapellet wurde, wie oben beschrieben, nach der vierten und fünften Zentrifugation abgetrennt. Durch die erhöhte Menge des (zwar unterschiedlich, aber dennoch stark) verdünnten Plasmas wurden Unterschiede in der adsorbierten Menge erwartet. Zusätzlich wurden in

weiteren Proben die Waschschrirte mit Phosphatpuffer/NaCl pH 7,4 durchgeföhrt, ohne zusätzliche Plasmamengen in den Proben zu belassen. Der Puffer hatte in vorherigen Versuchen offensichtlich gñnstigere Lösungseigenschaften für das IgG gezeigt, so daß dieses während der Waschschrirte nicht adsorbierte (6.3.3). Die Tabelle 9.1 /1 zeigt die prozentualen Anteile des IgG nach den verschiedenen Separationsverfahren.

Tab. 9.1 /1: Prozentualer Anteil des IgG γ an der Gesamtmenge detektiierter Proteine auf PS 60-407. Adsorption nach unterschiedlich durchgeföhrt Separation. (Z. = Zentrifugation, * n = 3, ** n = 6, Mittelwerte \pm Standardabweichungen)

Nach 1., 2., 3. Z. 20 μ l zusätzliches (verdünntes) Plasma in Probe belassen.*	Nach 1., 2., 3. Z. kein zusätzliches (verdünntes) Plasma in Probe belassen.**	Alle Waschschrirte mit PBS/NaCl pH 7,4 durchgeföhrt.*
26,6 \pm 6,37	4,1 \pm 3,62	0 \pm 0

Durch das zusätzliche (verdünnte) Plasma während der Waschschrirte adsorbierte eine wesentlich größere Menge IgG auf den Partikeln, während die Werte für die Apolipoproteine nach Berücksichtigung der IgG-Werte gleich blieben, d. h. es fand eine IgG-Adsorption aus verdünntem Plasma statt. Dies deutet darauf hin, daß die IgG-Werte in den Proben ohne zusätzliches Plasma, aber mit dem Plasma, das sich zwischen den Partikeln im lockeren Sediment befand (Tab. 9.1 /1, mittlerer Block), ebenfalls als eine Adsorption aus verdünntem Plasma angesehen werden müssen. Dafür spricht zusätzlich die große Streuung der Werte, die auf die kaum zu kontrollierende Restmenge Plasma im Sediment zurückgeföhrt werden kann. Schließlich ergab die Verwendung des Puffers während der Waschschrirte überhaupt keine IgG-Adsorption. Die Zusammenfassung aller Beobachtungen führte somit zu dem Schluß, daß die detektierten Mengen IgG einer Adsorption aus verdünntem Plasma während der Waschschrirte zuzuschreiben und für die hier relevanten Adsorptionsmuster aus Vollplasma zu vernachlässigen waren.

9.2 Proteinadsorption auf modifizierten 60 nm Partikeln im Vergleich zu modifizierten 200 und 1000 nm Partikeln

9.2.1 Theoretische Voraussetzung

Nachdem mit den modifizierten 60 nm Partikeln (PS 60-908 und -407) im Kaninchenmodell eine Umgehung des MPS erzielt worden war, wurde versucht, dies auch auf größere Partikel zu übertragen. Dabei zeigte sich jedoch eine stark erhöhte Aufnahme in die MPS-Zellen, was auf die geringere Schichtdicke des Poloxamer-Überzugs und die höhere Hydrophobie der Partikel gegenüber den modifizierten PS 60 zurückgeführt wurde (Müller, 1991). Daß Schichtdicke und Hydrophobie allerdings nur sehr bedingt mit der Proteinadsorption korrelieren, konnte in Kapitel 7 gezeigt werden. Stattdessen war insbesondere die Oberflächendichte des Polyethylenoxids (PEO) in Verbindung mit der PEO-Kettenlänge von ausschlaggebender Bedeutung für die Proteinadsorption.

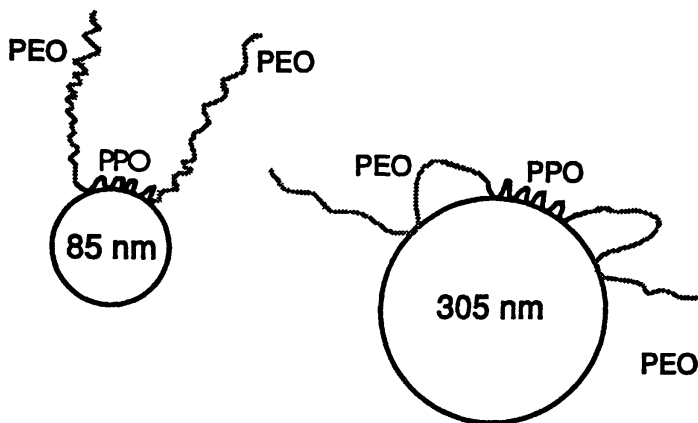


Abb. 9.2 /1: Konformation von adsorbiertem Poloxamer auf unterschiedlich großen Teilchen (nach Lee, J. et al., 1989).

Lee, J. et al. (1989) zogen aus ihren Experimenten den Schluß, daß das gleiche Poloxamer auf Partikeln mit unterschiedlicher Größe in verschiedenen Konformationen adsorbiert. Bei einer größeren Krümmung (kleinere Partikel) ist demnach eine flache Auflagerung (zahlreiche

Bindungsstellen) der Poloxamer-Ketten entropisch ungünstiger als auf größeren Partikeln mit einer kleineren Krümmung (Abb. 9.2 /1). Demzufolge werden auf kleineren Partikeln höhere PEO-Oberflächendichten erreicht, die sich gemäß Jeon et al. (1991) auf die Proteinadsorption auswirken müßten.

9.2.2 Unterschiede in der Proteinadsorption

Im folgenden soll die Proteinadsorption auf verschiedenen großen Partikeln, die mit Poloxamer 407 überzogen waren, dargestellt werden. Aufgrund der unvollständigen Rückgewinnung der inkubierten 60 nm Partikel (siehe 9.1) war ein genauer Vergleich der Gesamtmengen der adsorbierten Proteine auf den unterschiedlich großen Partikeln zwar nicht durchführbar, dennoch war eine deutliche semi-quantitative Aussage möglich. Es wurden sehr ähnliche Gesamtoberflächen von PS 60-407 und PS 200-407 inkubiert (0,45 und 0,43 m², berechnet als Oberfläche der unmodifizierten Partikel). Für die PS 60-407 wurde eine mehr als 7-fach geringere Proteinmenge detektiert (gemessen in cpm, gerechnet wurde mit den höchsten Werten der aufgrund der unterschiedlichen Rückgewinnungsrate großen Streubreite). Selbst bei einem (sehr hoch) angenommenen Partikelverlust von 50 % bliebe eine eindeutige Reduktion der adsorbierten Menge auf den kleineren Partikeln.

Da die absoluten Proteinmengen auf den PS 60-407 aufgrund der Partikelverluste größeren Streuungen unterlagen, war für eine Betrachtung der einzelnen Proteine nur eine Berechnung der prozentualen Anteile sinnvoll, um Mittelwerte aus mehreren Versuchen zu bilden. Dabei wurde aus den unter 9.1.3 erarbeiteten Gründen das IgG nicht berücksichtigt. Um die direkte Vergleichbarkeit zu wahren (auch zu PS 1000-407, Filtrationswerte, keine IgG-Adsorption), wurden die Werte für die Proteine auf den PS 200-407 ebenfalls ohne die Mengen des IgG berechnet (siehe auch die Erörterung in 7.1.2).

PS 200-407 und PS 1000-407 zeigten sehr ähnliche Adsorptionsmuster, die insbesondere von den drei Hauptproteinen PLS:6, ApoJ und ApoC-III geprägt waren, wenn diese auch jeweils unterschiedliche Anteile aufwiesen (Tab 9.2 /1). Daneben waren auf beiden Partikeln Fibrinogen, Albumin, Actin, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-II mit Anteilen zwischen 1 und 3% vertreten, auf PS 200-407 zusätzlich U2 und Transthyretin im gleichen Bereich, die auf PS 1000-407 knapp unter 1 % lagen. Diese Proteine machten zusammen auf beiden Partikeln ca. 80 % aus, der Rest der Gele wurde von einer Vielzahl kleiner Spots gebildet, von denen keiner einen Anteil > 0,5 % besaß.

Die PS 60-407 zeigten dagegen ein völlig anderes Adsorptionsmuster. Es wurden nur die Apolipoproteine A-I, A-II, A-IV, C-II, C-III, E und J identifiziert. Sie machten zusammen über 97 % des gesamten Gels aus, wobei ApoA-IV mit über 45 % das dominierende Protein war. Die restlichen Spots konnten nicht identifiziert werden, es besaß jedoch keiner einen Anteil > 0,2 %. Die Tabelle 9.2 /1 faßt noch einmal die Anteile der Hauptproteine (> 5 %) auf den drei Partikeln unterschiedlicher Größe zusammen.

Tab. 9.2 /1: Adsorbierte Hauptproteine (Anteil am Gesamtgel > 5 %) auf mit Poloxamer 407 modifizierten Partikeln unterschiedlicher Größe (IgG auf PS 60-407 und PS 200-407 nicht berücksichtigt, siehe Text), (s=Standardabweichung).

Protein	PS 60- 407		Protein	PS 200- 407		PS 1000- 407	
	Anteile [%]	s (n=6)		Anteile [%]	s (n=3)	Anteile [%]	s (n=2)
ApoA-IV	45,7	6,85	PLS:6	23,8	5,83	39,7	3,25
ApoC-III	18,1	1,97	ApoJ	27,1	3,03	16,0	3,46
ApoA-I	12,5	2,57	ApoC-III	8,0	1,94	11,5	1,27
ApoC-II	9,3	1,98					
ApoA-II	7,0	1,65					

9.2.3 Mögliche Korrelationen der Proteinadsorption mit den Oberflächeneigenschaften

Es wäre in diesem Fall zwar möglich, die unterschiedliche Proteinadsorption auf verschieden dicke Überzugsschichten (dickster Überzug auf PS 60-407) oder teilweise auf eine unterschiedliche Hydrophobie (PS 60-407 < PS 200 < PS 1000-407, (Müller, 1991; Wesemeyer 1993)) zurückzuführen. Da dies bezüglich der Hydrophobie im Vergleich von PS 200-407 und PS 1000-407 jedoch aufgrund der ähnlichen Proteinmengen und Adsorptionsmuster bereits keine Gültigkeit mehr hat und diese Art der simplen Korrelation auch auf anderen Partikeln keinen Bestand hatte (Kapitel 7), wird wiederum die Betrachtung der Konformationen der Poloxamere vorgenommen.

Wie unter 9.2.1 dargelegt, lag auf den PS 60-407 eine höhere PEO-Oberflächendichte vor. Diese führte wie erwartet gemäß Jeon et al. (1991) zu einer erheblichen Reduktion der Proteinadsorption. Interessant sind dabei, wie in Kapitel 7, wiederum die Hauptproteine der unmodifizierten Partikel. Auf den unmodifizierten PS 60 (nicht gezeigt) besaßen Fibrinogen

und PLS:6 die größten Anteile. Diese waren im Gegensatz zu den modifizierten größeren Partikeln auf den PS 60-407 überhaupt nicht mehr vorhanden, wobei insbesondere der große Anteil des PLS:6 auf den PS 200-407 und PS 1000-407 auf eine geringere PEO-Oberflächendichte hinwies. Durch die höhere PEO-Oberflächendichte auf den PS 60-407 wurde eine Interaktion der für das unmodifizierte Polystyrol typischen, relativ großen Proteine mit dem hydrophoben Substrat (PS) vermieden. Erläuterungen zur starken Adsorption der Apolipoproteine finden sich unter 9.3.5.

Die durch die Krümmung der Partikel verursachten Konformationen der Poloxamere unterschieden sich offenbar stärker zwischen PS 60-407 und PS 200-407 als zwischen PS 200-407 und PS 1000-407. Unterhalb einer bestimmten Krümmung scheint es für die Poloxamer-Ketten entropisch einen geringeren Unterschied zu machen, wenn sie auf verschiedenen großen Partikeln in ähnlicher Konformation (ähnlich flach) adsorbieren (siehe Abb. 9.2.1). Allerdings führte auch der geringere Unterschied zwischen den beiden größeren Partikeln, ähnlich wie in Kapitel 7, zu einer stärkeren Reduktion der Adsorption eines Polystyrol-Hauptproteins (hier PLS:6, Tab. 9.2 /1) auf den PS 200-407, so daß hier ebenfalls gemäß Lee et al. (1989) eine höhere PEO-Oberflächendichte gegenüber den PS 1000-407 Bestätigung fand.

Die für Partikel, die mit unterschiedlichen Poloxameren modifiziert waren, gefundenen Korrelationen der Adsorptionsmuster zur Poloxamer-Konformation haben demnach auch für mit dem gleichen Poloxamer überzogenen Partikel unterschiedlicher Größe Gültigkeit. Ein allgemein ableitbares Prinzip, das dem theoretischen Konzept von Jeon et al. (1991) entspricht, erhält daher eine hohe Wahrscheinlichkeit.

9.3 Proteinadsorption auf PS 60-407 und PS 60-908

9.3.1 Der erste Vergleich

Nachdem anhand eines Partikelsystems (PS 60-407) das Problem der Separation vom Plasma gelöst und das Proteinadsorptionsmuster aufgeklärt worden war, konnte der Vergleich mit PS 60-908 unternommen werden. Verwendet wurde zunächst gemäß der Erkenntnisse aus 6.4 das gefrorene Plasma eines Spenders (Vergleichbarkeit mit anderen Arzneistoffträgern, z.B. den Emulsionen, Kap. 10). Inkubiert wurde wie in 9.1 beschrieben. Es ergaben sich, wie nach den großen Ähnlichkeiten bezüglich der physikochemischen Charakterisierung (Müller, 1991) zu erwarten war,

qualitativ gleichartige Adsorptionsmuster. Wie auf den PS 60-407 adsorbierten auch auf den PS 60-908 die oben genannten sieben Apolipoproteine und machten zusammen ebenfalls über 97 % des Gels aus. Die restlichen Spots wurden ebenfalls überwiegend auf beiden Gelen detektiert, es ergaben sich Anteile ungepaarter Spots < 1 %, wobei kein ungepaarter Spot > 0,2 % war (trotz unterschiedlicher Partikel!). Es wurden keine Hinweise auf Unterschiede in der Gesamtmenge gefunden, wobei in Anbetracht der relativ großen Streuungen der absoluten Werte eine abschließende Aussage nicht möglich war.

Im Gegensatz zur qualitativen Gleichheit unterschieden sich jedoch die relativen Anteile der Apolipoproteine an den Gesamtmengen teilweise drastisch auf den beiden Partikeln. Die Abb. 9.3 /1 zeigt jeweils die Apolipoproteine in einer Vergrößerung des betreffenden Gelausschnitts. In Abb. 9.3 /2 sind ihre prozentualen Anteile graphisch dargestellt.

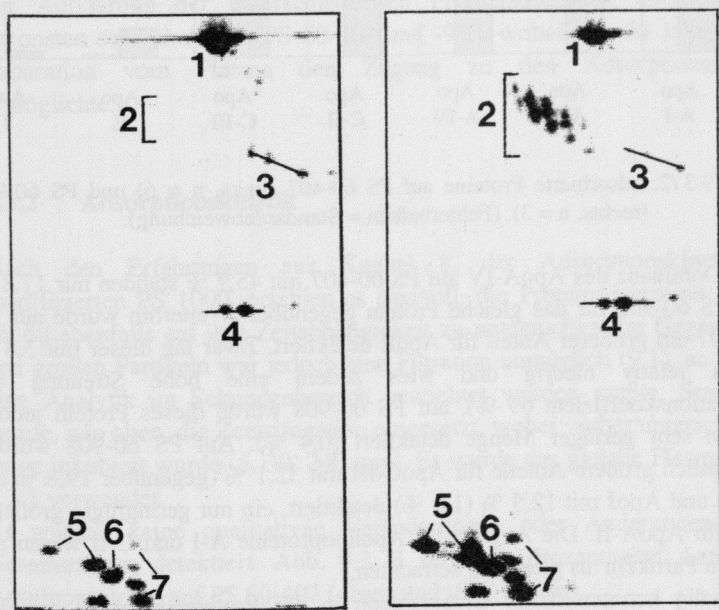


Abb. 9.3 /1: Proteinadsorptionsmuster auf PS 60-407 (links) und PS 60-908 (rechts). Detektiert wurden jeweils sieben Apolipoproteine mit teilweise deutlich unterschiedlichen relativen Anteilen.

(1) ApoA-IV, (2) ApoJ, (3) ApoE, (4) ApoA-I, (5) ApoC-III, (6) ApoC-II, (7) ApoA-II. Ausschnitt der Gele: pI 4,4 - 6,0, MG 6 - 46 kDa.

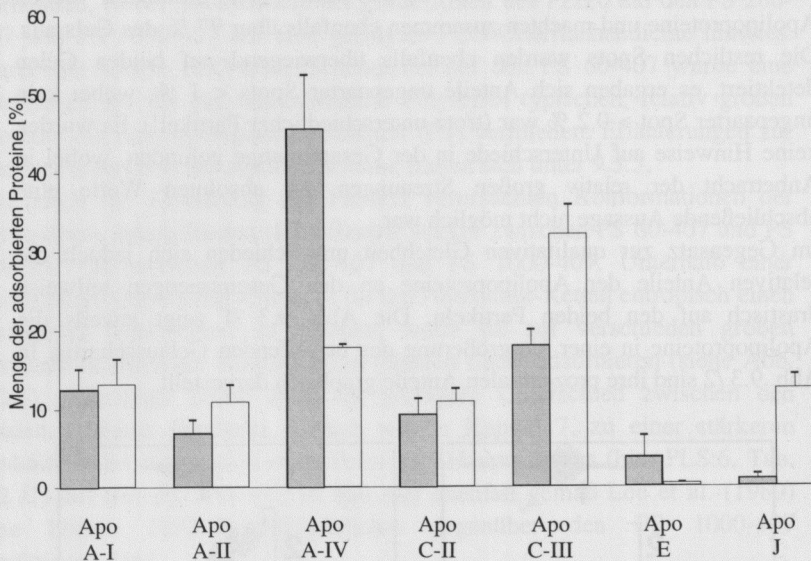


Abb. 9.3 /2: Adsorbierte Proteine auf PS 60-407 (links, n = 6) und PS 60-908 (rechts, n = 3), (Fehlerbalken = Standardabweichung).

Der Dominanz des ApoA-IV auf PS 60-407 mit 45,7 % standen nur 17,8 % auf PS 60-908 für das gleiche Protein gegenüber. Weiterhin wurde auf PS 60-407 ein größerer Anteil für ApoE detektiert. Zwar lag dieser mit 3,8 % selbst relativ niedrig und wies zudem eine hohe Streuung auf (Variationskoeffizient 69 %), auf PS 60-908 wurde dieses Protein jedoch nur in sehr geringer Menge detektiert (0,4 %). Auf PS 60-908 wurden wesentlich größere Anteile für ApoC-III mit 32,1 % (gegenüber 19,8 % auf -407) und ApoJ mit 12,5 % (1,0 %) detektiert, ein nur geringfügig größerer Teil für ApoA-II. Die Anteile der Apolipoproteine A-I und C-II waren auf beiden Partikeln als gleich zu betrachten.

Erstmalig konnten damit Unterschiede in der Proteinadsorption auf den beiden Partikeln nachgewiesen werden. Norman et al. (1993a) hatten stellvertretend für die PS 60 andere Polystyrol-Partikel mit einem Durchmesser von 1,2 μm , modifiziert mit den gleichen Block-Copolymeren, bezüglich ihrer Proteinadsorption untersucht und keine Unterschiede gefunden. Verwendet wurde SDS-PAGE (eindimensionale Auftrennung der Proteine) in Kombination mit Immunoblotting. Es wurde von Norman et al.

beabsichtigt, eventuell zu findende Unterschiede mit dem unterschiedlichen *In-vivo*-Verhalten der PS 60-407 und -908 zu korrelieren. Daß dies aufgrund der unterschiedlichen Block-Copolymer-Konformationen auf den verschieden großen Partikeln von vornherein als fragwürdig zu betrachten ist, zeigen die gänzlich unterschiedlichen Adsorptionsmuster auf den 60 nm Partikeln gegenüber denen auf den größeren Partikeln (Abschnitt 9.2.2). Zudem wurde als höchste Plasmakonzentration von Norman et al. 50 % (V/V) eingesetzt. Die hier präsentierten Ergebnisse der 60 nm Partikel wurden mit einer Plasmakonzentration von 92 % (V/V) erzielt. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Adsorptionsmuster bei Verwendung von 96 % (V/V) Plasma nicht veränderten. Nach Adsorption aus 50 % (V/V) Plasma wurden zwar keine zusätzlichen Proteine detektiert, jedoch verschoben sich die Anteile der Apolipoproteine teilweise deutlich, und ApoE wurde gar nicht mehr detektiert (Daten hier nicht präsentiert). Die entwickelte 2D-PAGE-Analytik inklusive der Probenvorbereitung erwies sich als geeignet zur Aufklärung der unterschiedlichen Proteinadsorption auch auf den ansonsten sehr ähnlichen PS 60-407 und -908, wobei erst die komplizierte Separation vom Plasma den Zugang zu den Adsorptionsmustern ermöglichte.

9.3.2 Adsorptionskinetik

Nach den Erfahrungen aus Kapitel 8, der Adsorptionskinetik auf modifizierten PS 1000, erschien es sinnvoll, die Proteinadsorption auf den PS 60 ebenfalls auf ihre Zeitabhängigkeit zu untersuchen. Im Gegensatz zu den großen Partikeln war jedoch eine Filtration unmöglich (9.1), so daß auf eine Analytik im Sekundenbereich verzichtet werden mußte. Stattdessen wurde, wie oben, die Zentrifugation eingesetzt, wobei vorher unterschiedlich lange inkubiert wurde (5, 30, 240 min). Es wurde das gleiche Plasma wie in 9.3.1 verwendet.

Es wurden keine qualitativen Veränderungen oder Änderungen in der Gesamtmenge detektiert. Abb. 9.3 /3 zeigt die prozentualen Anteile der Apolipoproteine auf PS 60-407 (oben) und -908 (unten).

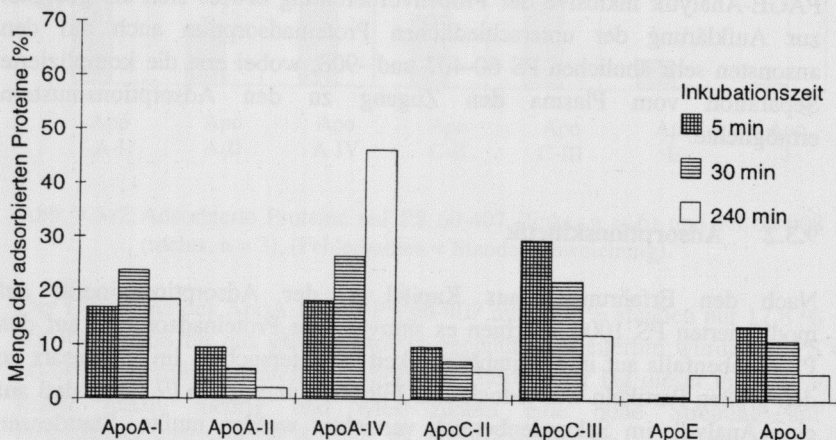
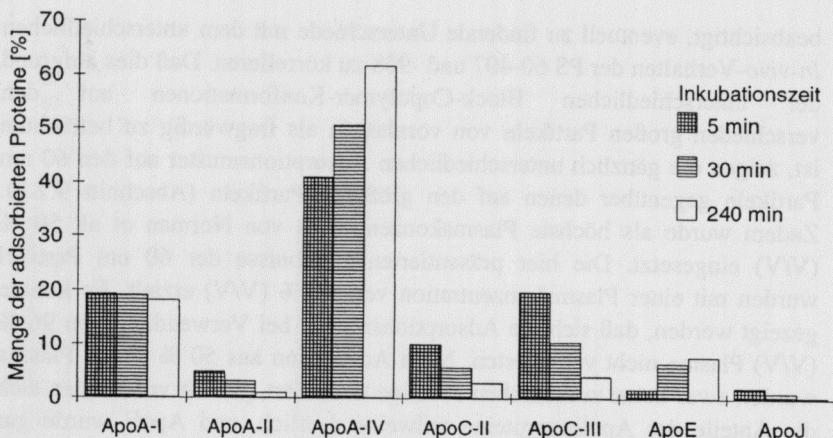


Abb. 9.3 /3: Proteinadsorptionskinetik: Die Darstellung verdeutlicht gleiche Tendenzen der einzelnen Proteine auf beiden Partikeln, PS 60-407 (oben) und PS 60-908 (unten).

Ähnlich wie auf den modifizierten PS 1000 waren auf beiden Partikeln für die einzelnen Proteine die gleichen zeitlichen Abhängigkeiten zu beobachten. Die Anteile der Apolipoproteine A-IV und E stiegen auf beiden Partikeln, während die Anteile der Apolipoproteine A-II, C-II, C-III und J jeweils kontinuierlich zurückgingen. ApoA-I blieb auf den PS 60-407 über den gesamten Versuchszeitraum konstant, während es auf den PS 60-908 zunächst einen Anstieg zu verzeichnen hatte, nach 4 h aber wieder nahezu

auf den Ausgangswert zurückging. Das Verhalten der Proteine ApoC-III und J (Rückgang) und ApoE (Anstieg) deckte sich damit mit dem auf den modifizierten PS 1000 (Kap. 8, Abb. 8.1 /1). ApoA-I war auf den PS 1000 das einzige der Hauptproteine, das mit einem kontinuierlichen Anstieg eine andere Kinetik zeigte als auf den PS 60 (Konstanz). Die Apolipoproteine A-II, A-IV und C-II waren auf den modifizierten PS 1000 mit deutlich geringeren Anteilen vertreten, aber selbst hier waren für ApoA-II (leichter Rückgang) und ApoA-IV (leichter Anstieg) die gleichen Tendenzen wie auf den PS 60 (mit höheren Anteilen) zu beobachten.

Auffällig war auf den PS 60-407 die große Menge ApoA-IV, durch die alle anderen Proteine mit Ausnahme des konstanten ApoA-I nach 4 h auf einen Anteil < 10 % reduziert waren (Tab. 9.3 /1).

Tab. 9.3 /1: Proteinadsorptionskinetik: Gegenübergestellt sind jeweils PS 60-407 und PS 60-908 nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten.

	5 min		30 min		240 min	
	PS 60-407	PS 60-908	PS 60-407	PS 60-908	PS 60-407	PS 60-908
ApoA-I	19,2	16,8	19,4	23,7	18,1	18,3
ApoA-II	4,8	9,5	3,1	5,5	1,0	2,0
ApoA-IV	41,0	18,1	50,7	26,4	61,7	46,1
ApoC-II	10,0	9,7	5,7	7,0	2,9	5,2
ApoC-III	19,8	29,5	10,4	21,9	4,0	12,0
ApoE	1,7	0,3	6,5	0,8	7,7	4,9
ApoJ	2,0	13,8	1,0	11,1	0,3	5,0

Mindestens ebenso bemerkenswert wie auf den PS 60-407, auf denen das ApoA-IV von vornherein (5 min) das dominierende Protein gewesen war, war jedoch dessen Steigerung auf den PS 60-908. Nachdem die Menge des ApoA-IV anfänglich (5 min) nur unwesentlich über der des ApoA-I und deutlich unter der des ApoC-III gelegen hatte, war ApoA-IV nach 4 h auch auf diesem Partikel mit Abstand das Hauptprotein des Adsorptionsmusters (Abb. 9.3 /1 und Tab. 9.3 /1).

Da die ApoA-IV-Adsorption auf beiden Partikeln steigend war - zulasten der vier oben genannten Proteine mit fallenden Anteilen -, sich zudem die Anteile des geringer steigenden ApoE annäherten und da ApoA-I inzwischen auf beiden Partikeln das zweitstärkste Protein war, kann man von sich allmählich ähnlicher werdenden Adsorptionsmustern sprechen

(Tab. 9.3 /1). Für eine im wesentlichen gleichgeartete Abfolge der Proteinadsorption, die letztendlich möglicherweise im gleichen Adsorptionsmuster mündet, spricht die Ähnlichkeit der prozentualen Anteile der PS 60-407 nach 30 min und der PS 60-908 nach 4 h.

Dennoch waren nach 4 h neben dem Unterschied in den großen Mengen ApoA-IV (61,7 und 46,1 %) noch nennenswerte Unterschiede für ApoC-III (4,0 und 12,0 %) und ApoJ (0,3 und 5,0 %) zu verzeichnen (Tab. 9.3 /1). Inwieweit bei noch längerer Inkubation eine weitere Angleichung der Mengenverhältnisse stattfinden würde, kann Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Bei Betrachtung der Adsorptionskinetik muß für eventuelle Rückschlüsse auf die Gegebenheiten *in vivo* beachtet werden, daß in den vorgestellten Untersuchungen die Inkubation statisch in einem Gefäß vollzogen wurde. Eine Inkubation, die zusätzlich den Blutstrom simuliert, würde möglicherweise gerade bezüglich der Kinetik Abweichungen ergeben. Gewarnt werden soll an dieser Stelle daher vor einer vorschnellen Korrelation der gefundenen Adsorption zu *absoluten* Zeitpunkten mit einem bestimmten *In-vivo*-Verhalten. Die aufgezeigten Prinzipien der Verdrängung von der Oberfläche und der sukzessiven Annäherung der Adsorptionsmuster werden jedoch als gültig angesehen.

9.3.3 Vergleich der Plasmen unterschiedlicher Spender

Wie nach den Erfahrungen in 6.4 beabsichtigt, wurden diese Partikel mit *In-vivo*-Relevanz zusätzlich zu den Routineuntersuchungen im gefrorenen Plasma eines Spenders im Frischplasma mehrerer Spender untersucht. Die Inkubations- und Separationsbedingungen entsprachen denen aus 9.1. Die Tabelle 9.3 /2 zeigt die Anteile der adsorbierten Proteine.

Generell fanden die im Vergleich der beiden Partikel in 9.3.1 (ein Spender) gefundenen Ergebnisse Bestätigung. Bei allen vier Spendern wurden größere Anteile auf PS 60-407 für ApoA-IV und E gefunden, größere Anteile auf PS 60-908 dagegen für ApoA-II, C-III und J. Die Anteile für ApoC-II waren wiederum jeweils ähnlich. Lediglich ApoA-I zeigte aus dem Plasma dieser Spender einen leicht höheren Anteil auf PS 60-407, während es in den ersten Versuchen (9.3.1) auf beiden Partikeln nahezu gleiche Anteile besessen hatte.

Tab. 9.3 /2: Proteinadsorption (prozentuale Anteile an der Gesamtproteinmenge) aus dem Plasma unterschiedlicher Spender auf
a) PS 60-407 und b) PS 60-908,
(x = Mittelwert [%], s = Standardabweichung [%], v = Variationskoeffizient in %).

a) PS 60-407	Spender A	Spender B	Spender C	Spender D	x	s	v
ApoA-I	16,8	19,0	15,3	13,4	16,1	2,36	14,6
ApoA-II	10,2	5,1	10,0	6,8	8,0	2,48	30,9
ApoA-IV	32,0	32,3	31,5	41,4	34,3	4,75	13,8
ApoC-II	8,0	8,3	10,3	10,2	9,2	1,22	13,3
ApoC-III	15,7	13,9	19,4	17,9	16,7	2,44	14,6
ApoE	2,6	6,2	3,8	6,6	4,8	1,93	40,2
ApoJ	10,8	12,3	8,3	1,2	8,1	4,92	60,4

b) PS 60-908	Spender A	Spender B	Spender C	Spender D	x	s	v
ApoA-I	12,4	13,3	11,1	12,2	12,3	0,91	7,4
ApoA-II	18,8	11,1	10,7	13,2	13,5	3,76	27,9
ApoA-IV	16,4	15,6	15,1	17,1	16,0	0,91	5,7
ApoC-II	7,3	8,0	7,9	9,2	8,1	0,79	9,7
ApoC-III	27,8	24,5	27,7	30,8	27,7	2,59	9,4
ApoE	0,9	2,1	1,2	1,9	1,5	0,57	37,4
ApoJ	13,2	21,8	23,8	14,2	18,3	5,37	29,4

Interessant ist jedoch, daß es bei Betrachtung eines Partikels offensichtlich teilweise zu Unterschieden zwischen den Spendern kommt. Auf den PS 60-407 wurde für den Spender D ein Absorptionsmuster beobachtet, daß dem in 9.3.1 sehr ähnlich war (vgl. Abb. 9.3 /2). Die Spender A, B und C fielen dagegen durch einen niedrigeren Anteil für ApoA-IV auf, das allerdings weiterhin das Hauptprotein darstellte. Die Reduktion des ApoA-IV ging einher mit einer starken Steigerung des ApoJ und einer geringeren Steigerung des ApoA-I (Tab. 9.3 /2). Für ApoJ wurde denn auch (trotz Anteilen > 10 %) ein ungewöhnlich hoher Variationskoeffizient (v) von 60 % verzeichnet. Insbesondere durch diese starken Unterschiede des ApoJ kann es zu nicht unerheblichen Verschiebungen der Verhältnisse zweier Apolipoproteine kommen. Beispielsweise war für die Spender A, B und C der Quotient aus Anteil ApoA-IV und Anteil ApoJ < 4, während er für Spender D, wie auch in den Untersuchungen in 9.3.1, einen Wert > 30

annahm. Stärkere Streuungen wurden weiterhin für ApoC-II ($v = 31 \%$) und ApoE ($v = 40 \%$) beobachtet, wobei zumindest für ApoE allein deshalb nicht unbedingt von einer Spenderspezifität gesprochen werden kann, da für dieses Protein schon nach Adsorption aus *einem* Plasma große Streuungen detektiert wurden.

Auf PS 60-908 wurden die größten Unterschiede zwischen den Spendern ebenfalls für die Apolipoproteine A-II, E und J gefunden (v für A-II und E jeweils knapp unter denen auf PS 60-407), wobei die Unterschiede des ApoJ ($v = 29 \%$) nicht so drastisch erschienen wie auf PS 60-407.

Festzuhalten bleibt demnach nach Adsorption aus dem Plasma mehrerer Spender einerseits ein stets ähnliches Verhältnis der Anteile *eines* Proteins auf den *beiden* Partikeln. Des weiteren sind die jeweiligen Hauptproteine auf beiden Partikeln für alle Spender gleich. Andererseits sind jedoch teilweise deutliche Unterschiede der Anteile eines Proteins auf einem Partikel zu verzeichnen, was zu stärkeren Verschiebungen der Quotienten zweier adsorbierter Proteine führen kann.

9.3.4 Proteinadsorption aus Kaninchenserum

Da die *In-vivo*-Studien, auf die hier teilweise Bezug genommen wird, im Kaninchenmodell stattfanden, erschien es sinnvoll, die Proteinadsorption auf den fraglichen Partikeln auch aus entsprechenden Medien zu untersuchen. Zur Verfügung stand ein Pool von Kaninchenserum (Sigma), in dem die Partikel wie unter 9.3.1 inkubiert wurden. Leider gibt es keine genaue Kartierung der Proteine des Kaninchensersums auf 2D-Gelen wie für das Humanplasma und einige weitere Tierarten. Dennoch ist es möglich, aufgrund der Ähnlichkeit der Koordinaten auf dem Gel bzw. des Erscheinungsbildes der Spots für einige Proteine vom Humanplasma auf das Kaninchenserum zu schließen und so den Spots bestimmte Proteine zuzuordnen. Die folgende Diskussion der Ergebnisse ist aber nur mit der ausdrücklichen Einschränkung anzusehen, daß noch keine eindeutige Identifizierung stattgefunden hat.

Es wurde das gleiche Phänomen beobachtet wie unter 9.1.2 beschrieben, d. h. auch hier fiel während der Separation ein Plasmapellet aus, der insbesondere einen großen Anteil IgM enthielt, welcher nach Abtrennung des Plasmapellets nicht mehr auf dem Gel erschien. Das eventuell während

der Separationsschritte adsorbierende IgG (9.1.3) konnte vernachlässigt werden, da die Anteile auf dem Gel $< 1\%$ waren.

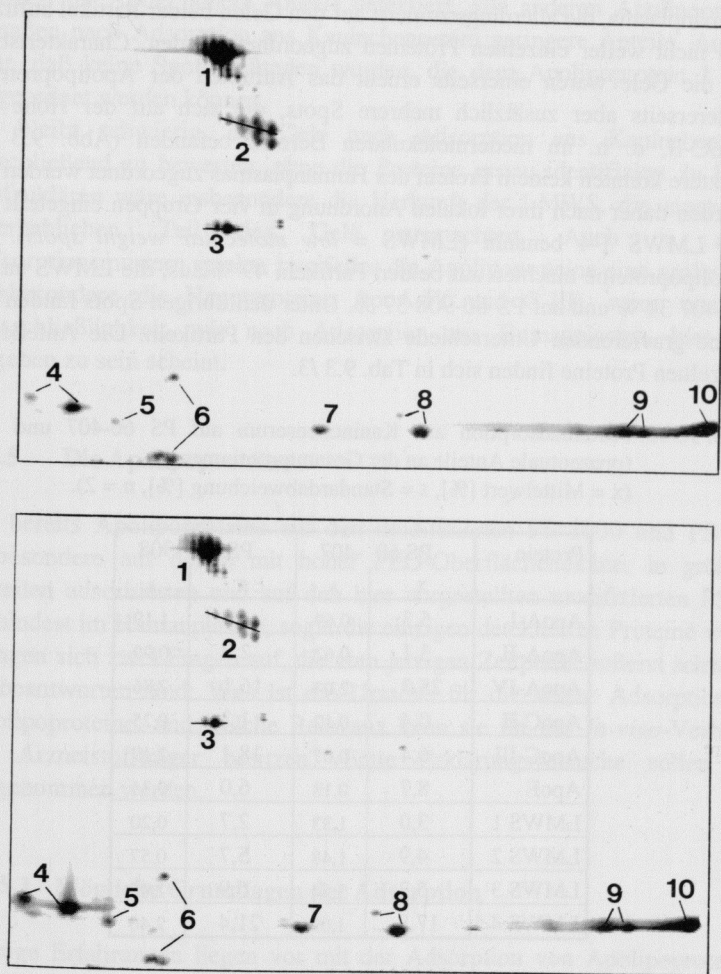


Abb. 9.3 /4: Proteinadsorption aus Kaninchenserum,
auf PS 60-407 (oben) und PS 60-908 (unten).
(1) ApoA-IV, (2) ApoE, (3) ApoA-I, (4) ApoC-III, (5) ApoC-II, (6)
ApoA-II, (7) LMWS 1, (8) LMWS 2, (9) LMWS 3, (10) LMWS 4,
Abszisse: pI 4,4 - 8,0; Ordinate: MG 6 - 46 kDa.

Die Gele besaßen nicht das klare, nur von den Apolipoproteinen geprägte Erscheinungsbild, sondern es wurden wesentlich mehr kleine Spots detektiert (hier nicht gezeigt) als nach der Adsorption aus dem Humanplasma, die allerdings zumeist auf den Gelen beider Partikel auftraten und nicht weiter einzelnen Proteinen zugeordnet wurden. Charakteristisch für die Gele waren einerseits erneut das Auftreten der Apolipoproteine, andererseits aber zusätzlich mehrere Spots, die sich auf der Höhe von ApoC-II, d. h. im niedermolekularen Bereich befanden (Abb. 9.3 /4). Letztere konnten keinem Protein des Humanplasmas zugeordnet werden und wurden daher nach ihrer lokalen Anordnung in vier Gruppen eingeteilt und mit LMWS 1-4 benannt (LMWS = *low molecular weight spots*). Die Apolipoproteine machten auf beiden Partikeln 49 % aus, die LMWS auf PS 60-407 31 % und auf PS 60-908 37 %. Unter den übrigen Spots fanden sich keine gravierenden Unterschiede zwischen den Partikeln. Die Anteile der einzelnen Proteine finden sich in Tab. 9.3 /3.

Tab. 9.3 /3: Proteinadsorption aus Kaninchenserum auf PS 60-407 und -908 (prozentuale Anteile an der Gesamtproteinmenge),
(\bar{x} = Mittelwert [%], s = Standardabweichung [%], $n = 2$).

Protein	PS 60 -407		PS 60 -908	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
ApoA-I	5,3	0,69	4,8	1,19
ApoA-II	3,1	0,62	2,8	0,99
ApoA-IV	25,3	2,03	16,1	2,86
ApoC-II	0,4	0,12	1,3	0,25
ApoC-III	6,4	0,07	18,1	2,19
ApoE	8,7	0,18	6,0	0,31
LMWS 1	3,0	1,33	2,7	0,20
LMWS 2	4,9	1,48	5,7	0,57
LMWS 3	5,2	3,54	6,9	2,06
LMWS 4	17,8	1,09	21,4	2,40

Interessanterweise wurden die deutlichsten Unterschiede erneut für die Apolipoproteine A-IV (höherer Anteil auf PS 60-407) und C-III (höherer Anteil auf PS 60-908) detektiert. Wie nach Adsorption aus Humanplasma stellte das ApoA-IV das Hauptprotein auf PS 60-407 dar, allerdings besaß auch LMWS 4 einen relativ hohen Anteil. Auf PS 60-908 verzeichnete LMWS 4 sogar den größten Anteil. ApoC-III adsorbierte von den Apolipoproteinen auf diesen Partikeln zwar wie im Humanplasma am

stärksten, jedoch war die Menge hier nur unwesentlich größer als die von ApoA-IV (Tab. 9.3/ 3). Die übrigen Proteine zeigten nur geringfügige Unterschiede auf den beiden Partikeln. Im Vergleich zum Humanplasma wurden für ApoE höhere Anteile detektiert, alle anderen Apolipoproteine besaßen nach Adsorption aus Kaninchenserum geringere Anteile. Auffällig war, daß keine Spots gefunden wurden, die dem Apolipoprotein J hätten zugeordnet werden können.

Es bleibt schwierig, die Gele nach Adsorption aus Kaninchenserum abschließend zu bewerten, ohne die Proteine genau identifiziert zu haben. Aufzuklären wäre insbesondere die Herkunft der LMWS, die einen nicht unerheblichen Teil des Gels ausmachten. Auch in diesen Adsorptionsmustern spielen zweifellos die Apolipoproteine eine große Rolle (insbesondere die Hauptproteine ApoA-IV und C-III), wenn auch die Ausschließlichkeit, wie nach Adsorption aus Humanplasma, hier nicht gegeben zu sein scheint.

9.3.5 Die Apolipoproteine

Da bereits Apolipoproteine auf den modifizierten PS 1000 und PS 200, insbesondere auf denen mit hoher PEO-Oberflächendichte, in größeren Anteilen adsorbierten und auf den hier vorgestellten modifizierten PS 60, zumindest im Humanplasma, sogar die einzigen detektierten Proteine waren, drängen sich zwei Fragen auf, die zum jetzigen Zeitpunkt äußerst schwierig zu beantworten sind: Was ist die Ursache für die starke Adsorption der Apolipoproteine, und welche Relevanz kann sie für das *In-vivo*-Verhalten der Arzneistoffträger besitzen? Erste Erklärungsversuche sollen hier vorgenommen werden.

9.3.5.1 Mögliche Grundlagen der Adsorption

Wenige Erfahrungen liegen vor mit der Adsorption von Apolipoproteinen auf festen Grenzflächen. Wesentlich genauer untersucht ist dagegen ihre Interaktion mit Lipiden, da sie im Fettstoffwechsel als Bestandteil der fetttransportierenden Lipoproteine eine wichtige Rolle spielen. Die Apolipoproteine der A-, C- und E-Klassen sind relativ klein, gut wasserlöslich und sind so schwach mit den Lipoproteinen assoziiert, daß ein Transfer zwischen den Lipoproteinen über die wäßrige Phase stattfinden kann (Pownall and Gotto, Jr., 1992).

Tab. 9.3/ 4: Eigenschaften der adsorbierten Apolipoproteine*, nach Scanu (1987).

	Molekular- gewicht	Aminosäuren	Konz. im Plasma [mg/100 ml]
ApoA-I	28016	243	100-200
ApoA-II	17440	154	30-40
ApoA-IV	46000	393	16-20
ApoC-II	8824	79	3-5
ApoC-III	8764	79	12-14
ApoE	34145	299	3-6

*Wenig bekannt ist über ApoJ, Molekulargewicht ca. 32000, nach Anderson und Anderson (1991), Hochstrasser, A.-C. et al. (1988) und Golaz et al. (1993).

Die Apolipoproteine dieser Klassen besitzen eine flexible Struktur und können ihre Konformation nach Adsorption leicht ändern. Die Flexibilität rührt von der Sekundärstruktur her, die geprägt ist von amphipathischen α -Helices, die durch kurze, weniger regelmäßige, Prolin enthaltende Abschnitte verbunden sind, über die eine Rotation erfolgen kann. In wäßriger Lösung sind die α -Helices wahrscheinlich als Bündel angeordnet, in dem die hydrophoben Seitenketten nach innen gerichtet sind. Auf Oberflächen können die Helices unabhängig voneinander binden, sie sind dabei koplanar zur Oberfläche ausgerichtet (Phillips, 1992). Sie besitzen eine hydrophile (polare) Seite, die nach Adsorption der Wasserphase zugewandt ist, und eine hydrophobe (apolare) Seite, deren Seitenketten mit dem hydrophoben Substrat in Interaktion treten. Die Besonderheit der amphipathischen Helices der Apolipoproteine im Vergleich zu denen anderer, beispielsweise globulärer Proteine, ist die Ballung positiv geladener Residuen an der Grenzfläche (polar - nicht polar) und negativ geladener Residuen im Zentrum der polaren Seite der Helices. Diese Konformation erlaubt in den Lipoproteinen die hydrophobe Interaktion zwischen den Acyl-Ketten der Phospholipide und den hydrophoben Residuen der apolaren Seite. Diese Aminosäure-Seitenketten sind senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet und können in die Lipidphase eintauchen (Rosseneu et al., 1992).

Aufgrund der dargestellten Eigenschaften erscheint es unwahrscheinlich, daß die Apolipoproteine außen an den PEO-Ketten der modifizierten PS 60

adsorbierten, da dort kaum Möglichkeit der hydrophoben Interaktion für die apolare Seite der Helices gegeben war. Eher denkbar ist die Interaktion mit dem darunterliegenden Polystyrol, zumal auch von anderen Autoren die Bindung von Apolipoproteinen an hydrophobe Substrate (Silikonisiertes Glas, PVC, Polystyrol) beschrieben wurde (Shen, 1985; Bremhaar et al., 1984). Wie in 9.2 erarbeitet, war auf den PS 60 die PEO-Oberflächendichte derart hoch, daß keine anderen Proteine mit dem Polystyrol interagieren konnten. Das PLS:6, eines der Proteine mit höherer Affinität zum Polystyrol, besitzt ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa (Anderson und Anderson, 1991) und war damit offenbar bereits zu groß für eine Penetration der PEO-Ketten auf den modifizierten PS 60, während es auf den mit den gleichen Poloxameren modifizierten PS 200 bzw. PS 1000 noch zu den Hauptproteinen gehört hatte (9.2.2). Die Apolipoproteine scheinen gerade diese Fähigkeit, die PEO-Ketten auch bei relativ hoher PEO-Oberflächendichte zu durchdringen, zu besitzen. Demzufolge müßte von einer Vorstellung undurchdringbar eng zusammenstehender Poloxamermoleküle auf den modifizierten PS 60 Abstand genommen werden, zumindest von einer absolut homogenen derartigen Oberfläche. Die langen PEO-Ketten würden selbst auf diesen Partikeln eine engste Annäherung der Block-Copolymere verhindern, und aus der Beweglichkeit eben dieser PEO-Ketten würden sich immer wieder - wenn hier auch kleine - Räume für sich nähernde Proteine ergeben. Aufgrund ihrer relativ geringen Größe und der Konformation im wäßrigen Medium mit den nach außen gerichteten hydrophilen Seiten der α -Helices könnten die Apolipoproteine in der räumlich beschränkten und wasserähnlichen Umgebung der PEO-Ketten ohne Abstoßung diffundieren. Die Adsorption auf dem Polystyrol würde nach Entfaltung des Moleküls und Offenlegung der apolaren Seiten der Helices erfolgen.

Die Apolipoproteine der A-, C- und E-Klassen besitzen jeweils mehrere amphipathische Helices mit unterschiedlicher Länge und Aminosäuresequenz. Es ist schwierig auszumachen, welche Eigenschaft letztendlich die Oberflächenaktivität bestimmt. Interessant ist in diesem Zusammenhang wiederum die Größe. Aufgrund des durch die PEO-Ketten beschränkten Raumes erscheint es einleuchtend, wenn bevorzugt zunächst besonders kleine Moleküle adsorbieren. Ähnlich dem von Phillips (1992) vorgeschlagenen "Lipid-Compression"-Modell, in dem adsorbierende Apolipoproteine Lipidmoleküle auf der Oberfläche Luft/Wasser komprimieren, so daß der Oberflächendruck steigt, könnte man sich auch auf den Partikeloberflächen eine zusammenschiebende Wirkung der

adsorbierenden kleineren Apolipoproteine auf die Block-Copolymere bzw. eine bewegungseinschränkende Wirkung auf die PEO-Ketten vorstellen. Nachdem auf diese Weise quasi Platz geschaffen worden ist, können sich nun auch größere Apolipoproteine annähern und eventuell die kleineren verdrängen, möglicherweise begünstigt durch eine höhere Zahl an Bindungsstellen, die das Molekül weniger anfällig gegenüber dem hohen Oberflächendruck machen. Dieser Gedanke der sequentiellen Adsorption findet in der Betrachtung der Adsorptionskinetik Bestätigung. Auffällig waren dort die stetig steigenden Mengen an ApoA-IV und ApoE, der größten Apolipoproteine in Tab. 9.3 /4. Diese verdrängten die kleineren ApoC-III, ApoC-II und Apo A-II (9.3.2, Tab. 9.3 /1). Zwar ging auch das relativ große ApoJ im für die PS 60 vermessenen Zeitrahmen zurück, was sich jedoch mit Blick auf die Ergebnisse der modifizierten PS 1000 relativiert. Dort stieg auch der Anteil des ApoJ zugunsten des kleineren ApoC-III in den ersten fünf Minuten an, um danach ebenso wie auf den PS 60 wieder abzufallen (8.1, Tab. 8.1 /1). Verdrängt wurde es hier von den ähnlich großen ApoE und ApoA-I.

Selbstverständlich soll nicht die gesamte Abfolge der Adsorption allein auf den Größeneffekt zurückgeführt werden, aber es spricht einiges dafür, daß die Molekülgröße in diesem Fall nicht unerheblichen Einfluß besitzt. Welche molekularen Eigenschaften der Apolipoproteine ansonsten ausschlaggebend sind, insbesondere für die Präferenz der unterschiedlichen Partikel, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben. Es sei hier noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, daß das hier vorgeschlagene Modell der Adsorption der Apolipoproteine auf den mit PEO modifizierten Polystyrol-Oberflächen bis zur Verifizierung lediglich als eine Hypothese auf der Basis der vorgestellten Versuchsergebnisse anzusehen ist.

9.3.5.2 Mögliche Relevanz für das *In-vivo*-Verhalten

Die physiologische Bedeutung der Apolipoproteine umfaßt neben der Assoziation mit den Lipoproteinen des Plasmas die Aktivierung bestimmter Enzyme und die Bindung als Liganden an Rezeptoren. Für eine detaillierte Ausführung sei beispielsweise auf Gurr und Harwood (1991) verwiesen. Es soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die bekannten Hauptfunktionen der adsorbierten Apolipoproteine gegeben werden.

ApoA-I: ApoA-I ist das Hauptprotein der HDL, und es aktiviert die Lecithin-Cholesterol Acyltransferase (LCAT), ein Enzym, das für die

Bildung von Cholesteryl-Estern aus nicht verestertem Cholesterol und Lecithin im Plasma verantwortlich ist (Scanu, 1987). Es bindet wahrscheinlich an den HDL-Rezeptor auf Makrophagen sowie an Rezeptoren auf anderen peripheren Zellen und in der Leber (Beisiegel, 1992).

ApoA-II: ApoA-II stellt das zweithäufigste Protein in den HDL dar.

ApoA-IV: ApoA-IV hat zwar eine geringe Konzentration im Plasma, es liegt aber zu einem großen Teil nicht assoziiert mit Lipoproteinen vor. Es ist ansonsten hauptsächlich in Chylomikronen und HDL zu finden und ist wie ApoA-I ein Aktivator der LCAT. Es ist zwar nicht direkt am Eliminationsprozeß der HDL in der Leber beteiligt, moduliert aber wahrscheinlich die Verteilung des ApoE auf den Lipoproteinen, was zu einer Beeinflussung der Elimination führt (Scanu, 1987; Tenkanen und Ehnholm, 1993).

ApoC-II: ApoC-II ist assoziiert mit triglyceridreichen Partikeln und HDL. Es ist der spezifische Aktivator des Enzyms Lipoprotein-Lipase, das die Hydrolyse von Chylomikronen und VLDL fördert (Scanu, 1987).

ApoC-III: ApoC-III ist ebenfalls assoziiert mit triglyceridreichen Partikeln und HDL. Es hemmt die Leberaufnahme von triglyceridreichen Überresten ("remnants"), wahrscheinlich durch eine Modifikation oder Störung der Interaktion von ApoE, die ebenfalls auf diesen Partikeln vorhanden sind, mit dem spezifischen ApoE-Rezeptor in der Leber (Scanu, 1987; siehe auch Kap. 8: Aalto-Setälä, 1992).

ApoE: Im Plasma ist ApoE meist mit VLDL und HDL assoziiert. Es ist ein Ligand des LDL(ApoB/E)-Rezeptors in hepatischen und extrahepatischen Geweben. Außerdem ist es ein spezifischer Ligand des hepatischen ApoE-Rezeptors, der an der Aufnahme von Chylomikronen-Überresten beteiligt ist (siehe ApoC-III) (Scanu, 1987).

ApoJ: Wenig bekannt ist über die physiologische Funktion des ApoJ, das auch als Clusterin bezeichnet wird. Es ist assoziiert mit den HDL, und ihm werden membranprotektive Eigenschaften zugesprochen (Schmitz und Lackner, 1993).

Das Wissen über die physiologischen Funktionen der Apolipoproteine wächst zwar kontinuierlich, ist aber vielfach noch lückenhaft. Es ist daher zu diesem Zeitpunkt zu früh, einzelnen Apolipoproteinen das beobachtete *In-vivo*-Verhalten der vorgestellten Arzneistoffträger zuzuschreiben. Beachtet werden muß dabei zusätzlich, daß während der Dauer des Projektes die Arbeitsgruppe Illum eine *In-vivo*-Studie publizierte, in der das vorher beschriebene Knochenmark-Targeting (Illum und Davis, 1987) nur mit einer

von drei untersuchten Poloxamer 407-Chargen unterschiedlicher Hersteller erreicht wurde (Porter et al., 1992). Die übrigen ergaben einen höheren Anteil mit verlängerter Blutzirkulation und eine gegenüber den unmodifizierten Partikeln zwar verringerte, gegenüber der anderen Poloxamer-Charge jedoch erhöhte Leber-Aufnahme. Die Unterschiede wurden nach gelpermeationschromatographischen Untersuchungen auf unterschiedliche Oberflächendichten und Konformationen der verschiedenen Chargen Polxamer 407 zurückgeführt. Die Richtigkeit dieser Begründung erhält durch die Untersuchungen in Kapitel 7 und 9.2 eine hohe Wahrscheinlichkeit. Eine Untersuchung der durch die unterschiedlichen Chargen modifizierten Partikel auf ihre Proteinadsorption wäre von höchstem Interesse, leider standen sie bisher nicht zur Verfügung. Die hier präsentierten Ergebnisse der PS 60-407 (eine weitere unterschiedliche Charge) sind daher nicht ohne Vorbehalte im Zusammenhang mit einem Targeting zum Knochenmark anzusehen.

Allgemein werden für die letztendlich angestrebte Korrelation der adsorbierten Proteine zum *In-vivo*-Verhalten insbesondere mehr Informationen über Rezeptoren oder auch unspezifischere Bindungsstellen für die Apolipoproteine benötigt. Möglicherweise könnten dadurch über bereits bestehende Ansätze hinaus, die für ein Targeting zu den verschiedenen Lebergeweben modifizierte endogene Lipoproteine verwenden (Van Berkel, 1993), mit Nanopartikeln, modifiziert durch adsorbierte Apolipoproteine, gezielt andere Gewebe erreicht werden. Ob beispielsweise die physiologische eliminationshemmende Wirkung des ApoC-III auch für eine Verhinderung der Erkennung der PS 60-908 (Zirkulation im Blutkreislauf) verantwortlich ist, kann jedoch noch nicht beantwortet werden. Es stellt sich die Frage, inwiefern sich das Verhalten der Partikel ändert, wenn das ApoC-III im Laufe der Blutzirkulation durch andere Apolipoproteine (A-IV, E) verdrängt wird. Dabei spielt vermutlich das Mengenverhältnis der Proteine zueinander eine wichtige Rolle. Bei der Interpretation der Studie der Adsorptionskinetik sollte die Bedeutung der absoluten Inkubationszeiten *in vitro* allerdings nicht überschätzt werden, wichtig ist hier allein das allgemeine Prinzip der Verdrängung. Die Ergebnisse zu gleichen Zeiten können jedoch für unterschiedliche Partikel zueinander in Beziehung gesetzt werden. In einer weitgehenden Interpretation könnte argumentiert werden, daß die Anteile des ApoC-III auf den wesentlich schneller aus der Blutzirkulation eliminierten großen modifizierten Partikeln (Müller, 1991) schneller reduziert werden als auf den modifizierten PS 60. Nach 4 h waren die Anteile des ApoC-III auf den

modifizierten PS 1000 reduziert auf $< 2\%$ bzw. $< 1\%$, auf den PS 60-908 bzw. PS 60-407 dagegen erst auf 12% bzw. 4% . Ob daraus tatsächlich die längerwährende Nichterkennung der modifizierten PS 60 durch das MPS resultiert, müssen weitere Untersuchungen belegen. Ebenfalls weiterer Klärung bedarf die Rolle der großen Mengen des ApoA-IV.

Für eine mögliche Rezeptor- bzw. Bindungsstellenerkennung besitzt die Konformation der Apolipoproteine eine hohe Relevanz, so daß entsprechende Möglichkeiten der Konformationsuntersuchung nach Adsorption einen weiteren Schritt in Richtung Korrelation mit dem *In-vivo*-Verhalten bedeuten würden. Es ist auf jeden Fall erforderlich, weitere Partikel mit ähnlichen Eigenschaften testen zu können, um mögliche Korrelationen zu etablieren. Bevor endgültige Aussagen gemacht werden, sollten, wie bereits angesprochen, die Adsorption aus fließendem Plasma und die mögliche Interaktion der Partikel und Proteine mit den Blutzellen des Plasmas in die Untersuchungen einbezogen werden.

Von hoher Wichtigkeit ist dabei auch die Betrachtung der Adsorption aus den Plasmen der entsprechenden Versuchstiere. Die hier gezeigten Unterschiede zum Humanplasma, insbesondere das Erscheinen der LMWS nach Adsorption aus Kaninchenserum, bedürfen weiterer Aufklärung. Besonderes Augenmerk verdienen nach den dargelegten Versuchen des weiteren die Adsorptionskinetik und, auch nach den bisherigen Erkenntnissen über die Auswirkung der Verteilung der Apolipoproteine auf den Lipoproteinen, die Mengenverhältnisse der Apolipoproteine zueinander. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird nicht allein die bloße Anwesenheit eines Apolipoproteins auf einem Partikel entscheidend sein, sondern zusätzlich wird sich die Präsenz anderer modulierend auswirken können. Über die Adsorption der Proteine im Plasma hinaus sollte nach den gezeigten Ergebnissen, die ein hohes Potential der Apolipoproteine bezüglich der Beeinflussung des *In-vivo*-Verhaltens implizieren, auch eine Präadsorption dieser Proteingruppe vor der Inkubation/Injektion der Partikel verstärkt in Erwägung gezogen werden. Dies kann besondere Bedeutung erlangen, wenn sich die beobachtete teilweise Spenderspezifität auch auf anderen Partikeln manifestieren sollte und sich die Unterschiede als relevant für das *In-vivo*-Verhalten erweisen sollten.

9.4 Zusammenfassung

Polystyrol-Partikel mit einem Durchmesser von 60 nm wurden mit Poloxamer 407 (PS 60-407) und Poloxamine 908 (PS 60-908) überzogen. Derartige Partikel hatten im Kaninchenmodell ein unterschiedliches *In-vivo*-Verhalten gezeigt (Targeting zu den Endothelialzellen des Knochenmarks bzw. Blutzirkulation), wofür eine umfangreiche physikochemische Charakterisierung jedoch keine Erklärung liefern konnte, da keine nennenswerten Unterschiede gefunden wurden (Müller, 1991). Durch die Analytik der Plasmaproteinadsorption sollten mögliche Unterschiede zwischen den Partikeln aufgeklärt bzw. die modifizierten PS 60 mit größeren, bereits untersuchten Partikeln verglichen werden.

Durch ein aufwendiges Zentrifugationsverfahren gelang es, die modifizierten PS 60 nach Inkubation vom Plasma abzutrennen und ihre Proteinadsorptionsmuster zu bestimmen. Der Vergleich von PS 60-407 mit größeren Partikeln (PS 200 und PS 1000), die mit dem gleichen Block-Copolymer modifiziert waren, ergab deutliche Unterschiede. Die größeren Partikel verzeichneten eine deutlich höhere Menge adsorbierter Proteine und wiesen mit PLS:6 eines der Proteine in größerer Menge auf, das eine hohe Affinität zur unmodifizierten Polystyrol-Oberfläche gezeigt hatte, des weiteren als Hauptproteine ApoJ und ApoC-III. Daneben wurde eine Vielzahl weiterer Proteine detektiert. Dagegen wurden auf den PS 60-407 ausschließlich Apolipoproteine identifiziert (Gesamtanteil am Gel > 97 %), wobei ApoA-IV mit Abstand den größten Anteil besaß. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede wurden gemäß Lee, J. et al. (1989) auf die unterschiedliche Konformation des Poloxamers auf Partikeln verschiedener Größe zurückgeführt. Danach besitzen aufgrund flacherer Poloxamer-Adsorption größere Partikel eine geringere PEO-Oberflächendichte, was nach der Theorie von Jeon et al. (1991) zu einer geringeren Resistenz gegenüber der Proteinadsorption führt. Die erzielten Ergebnisse befinden sich damit in guter Übereinstimmung mit den bestehenden theoretischen Konzepten und bestätigen die in Kapitel 7 aufgezeigten Korrelationen der Proteinadsorption zu den Oberflächeneigenschaften. Weiterhin belegen sie, daß eine Übertragbarkeit der Eigenschaften von kleinen auf größere Partikel nicht zwangsläufig gegeben ist, wobei die resultierende unterschiedliche Proteinadsorption die Ursache für das beobachtete unterschiedliche *In-vivo*-Verhalten (Müller, 1991) sein kann.

Der Vergleich von PS 60-407 und -908 ergab in qualitativer Hinsicht gleiche Adsorptionsmuster, es wurden jeweils die Apolipoproteine A-I, A-II, A-IV, C-II, C-III, E und J detektiert. Es konnten jedoch starke quantitative

Unterschiede nachgewiesen werden. Nach fünfminütiger Inkubation wurden aus den Plasmen unterschiedlicher Spender übereinstimmend jeweils für PS 60-407 höhere Mengen ApoA-IV (Hauptprotein), ApoE und A-I detektiert, während sich auf PS 60-908 höhere Mengen ApoC-III (Hauptprotein), ApoJ und ApoA-II fanden. Es fiel hierbei allerdings eine Spenderspezifität auf, die zwar weder zu Änderungen bezüglich der Hauptproteine noch bezüglich der Präferenz der einzelnen Proteine für eines der Partikel führte, jedoch z. T. in Verschiebungen der Mengenverhältnisse der Apolipoproteine auf einem Partikel resultierte.

Die Untersuchung der Adsorptionskinetik erbrachte über den Inkubationszeitraum von 4 h auf beiden Partikeln dieselben Entwicklungen für die einzelnen Proteine. ApoA-IV zeigte jeweils einen starken Anstieg, der Anteil des ApoE wurde ebenfalls größer. Dagegen sanken die Anteile für ApoA-II, C-II, C-III und J, der des ApoA-I blieb konstant. Nach 4 h zeigten beide Adsorptionsmuster das gleiche Hauptprotein (ApoA-IV), wiesen aber noch Unterschiede in den prozentualen Anteilen auf.

Nach Inkubation in Kaninchenserum zeigten sich wiederum vermehrt Apolipoproteine auf den Gelen (prozentualer Anteil 49 %), zusätzlich wurden mehrere unidentifizierte Spots im niedermolekularen Bereich detektiert (31 % für PS 60-407 bzw. 37 % für PS 60-908). Die nennenswerten Unterschiede fanden sich erneut in den Apolipoproteinen C-III (deutlich höherer Anteil auf PS 60-908) und ApoA-IV (verstärkt auf PS 60-407), was mit der Adsorption aus Humanplasma übereinstimmt.

Die starke Adsorption der Apolipoproteine auf diesen Partikeln wird auf ihren besonderen molekularen Aufbau zurückgeführt. Die geringe Größe und die nach außen gerichtete hydrophile Seite der amphipathischen α -Helices ermöglicht demnach eine Diffusion zwischen den PEO-Ketten auch bei hoher PEO-Oberflächendichte, die Adsorption auf die Polystyrol-Oberfläche wird nach Auffaltung und Präsentation der hydrophoben Seite der Helices vollzogen. Die Molekülgröße wurde zudem als mögliche Ursache für den Verlauf der Adsorptionskinetik diskutiert. Gründe für die präferentielle Adsorption bestimmter Apolipoproteine auf den PS 60-908 bzw. PS 60-407 konnten noch nicht ausgemacht werden. Die Proteinadsorption aus Plasma ist jedoch das erste Kriterium, das eine deutliche Unterscheidung der beiden Partikel ermöglicht und eine wahrscheinliche Relevanz für das *In-vivo*-Verhalten besitzt. Möglicherweise ist ApoC-III, dessen physiologische eliminationshemmende Funktion beschrieben worden ist, an einer Umgehung des MPS mit folgender verlängerter Blutzirkulation beteiligt. Die Korrelation der Adsorption einzelner Proteine zu einer bestimmten Organverteilung erfordert selbstverständlich weitere Untersuchungen.

Jedoch scheinen die Apolipoproteine nach den gewonnen Erkenntnissen eine nicht unerhebliche Rolle für das *In-vivo*-Verhalten i. v. injizierter Nanopartikel zu spielen.

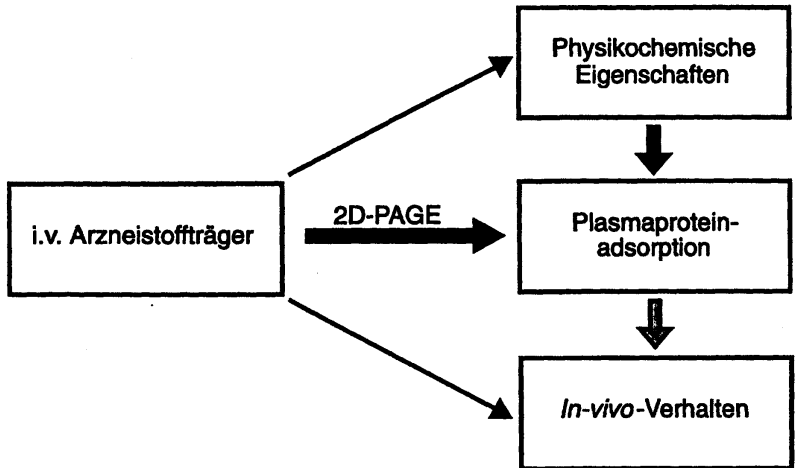


Abb. 9.4 /1: Erneut konnte die Proteinadsorption auf unterschiedlichen Partikeln mit der PEO-Oberflächendichte korreliert werden. Darüberhinaus besitzen nach den gezeigten Ergebnissen offensichtlich adsorbierte Apolipoproteine eine hohe Relevanz für das *In-vivo*-Verhalten der Arzneistoffträger. Die dargestellten Untersuchungen werden als geeignete Basis angesehen, mit Hilfe weiterer Studien definitive Korrelationen der Adsorption einzelner Proteine mit einem bestimmten *In-vivo*-Verhalten zu etablieren.

10 Proteinadsorption auf Emulsionen

Neben den vorrangigen Aufgaben, die 2D-PAGE-Analytik als Methode zu etablieren und die Proteinadsorption auf den vorgestellten Nanopartikeln zu bestimmen, stellte sich die Frage, ob die Analytik auch auf Emulsionen als Arzneistoffträgersysteme übertragbar wäre. Für Emulsionen sind ebenfalls diverse Oberflächenmodifikationen eingesetzt worden, um die Aufnahme durch MPS-Zellen zu verhindern bzw. die Verweilzeit in der Blutzirkulation zu verlängern (z.B. Jeppson und Rössner, 1975; Davis und Hansrani, 1985). Es sind Emulsionen mit den gleichen Block-Copolymeren als Emulgator herstellbar, die hier auch für die Modifikation der Nanopartikel benutzt wurden. So demonstrierten Illum et al. (1989) eine verlängerte Blutzirkulation einer Emulsion mit Poloxamine 908 als Emulgator, dem gleichen Block-Copolymer, das bereits auf den PS 60 für eine Umgehung des MPS gesorgt hatte. Im folgenden sollen erste Untersuchungen der Proteinadsorption auf verschiedenen Emulsionen vorgestellt werden.

10.1 Separation vom Plasma

Vor der Analytik der Proteinadsorption ergab sich jedoch das Problem der Separation der Emulsionen vom Plasma. Eine statische Filtration erwies sich schnell als unpraktikabel, da es, auch bei Verwendung von Rührzellen, zu Filterverstopfung kam. Eine Cross-Flow-Filtration könnte hier, wie unter 9.1 erwähnt, eventuell Abhilfe schaffen. Die Zentrifugation jedoch zeigte sich trotz anfänglicher Skepsis brauchbar, wobei allerdings die Bedingungen sorgfältig gewählt werden mußten. Da im Gegensatz zu den Partikeln die Fetttröpfchen eine geringere Dichte als das umgebende Medium besitzen, schwamm die Fettphase während der Zentrifugation auf. Zur Entfernung des überschüssigen Plasmas (Unterstand) wurde die Fettschicht mit einer langen Kanüle durchstoßen und das Plasma mittels Spritze abgesaugt. Die Tröpfchen konnten nach Verdünnung mit bidestilliertem Wasser wieder resuspendiert werden, so daß sich weitere Waschschrte anschließen konnten. Es wurde wieder mit 15000 g zentrifugiert, was sich auch aufgrund der sich ergebenden Zentrifugationszeit von 1 h als sinnvoll erwies. Es wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Rotor 8570 der Biofuge 17 RS, Heraeus-Sepatech, Osterrode) mehrere Mengenkombinationen Emulsion-Plasma (bzw. -Waschwasser) getestet und die Tröpfchengröße bzw. die verbleibende Oberfläche der Emulsion mit dem Laserdiffraktometer bestimmt. Zwar überstanden die Emulsionen den ersten Zentrifugationsschritt

ohne größere Schädigung, jedoch wurden in den weiteren Schritten die Gesamtoberflächen häufig kontinuierlich kleiner. Durch das Entfernen des Unterstandes inklusive des freien Emulgators und, nach Verdünnung mit Wasser, anschließender neuer Gleichgewichtseinstellung wurde der Emulgator offensichtlich ausgewaschen, was zusätzlich zu einer Instabilität und Verlusten der aufgeschwommenen Fettphase beim Absaugen führte. Eine von vornherein zu geringe Menge Emulsion resultierte daher in größeren Verlusten und einer extrem geringen Oberfläche. Diese mußte aber so gut wie möglich erhalten bleiben, da eine erhebliche Verringerung der Oberfläche durch vorzeitige Desorption der Proteine zu deutlichen Veränderungen der Adsorptionmuster hätte führen können. Es mußte demnach ein Kompromiß gefunden werden zwischen einer ausreichenden Menge Emulsion einerseits und einer möglichst großen Plasmamenge andererseits, um eine relativ hohe Konzentration des Plasmas zu erhalten. Eine Emulsionsmenge von 3 ml (20prozentige Emulsion) inkubiert in 9 ml Plasma erwies sich als praktikables Verhältnis, so daß die Emulsionsoberfläche weitestgehend erhalten blieb. Es wurde jeweils 4 x 1 h bei 15000 g zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Unterstand erneut abgesaugt und von der Fettphase 60 mg mit den solubilisierenden Lösungen zur Vorbereitung für die IEF (5.1.3) versetzt.

10.2 Emulsionen mit Block-Copolymeren als Emulgator

10.2.1 Größe der Oberfläche nach Separation vom Plasma

Es wurden Emulsionen mit acht verschiedenen Block-Copolymeren als Emulgator hergestellt, wobei zu denen in Kapitel 7 bereits als Überzugsmaterialien verwendeten Tensiden noch Poloxamer 338 hinzukam. Nach der Separation vom Plasma wurden mit dem Laserdiffraktometer die Teilchengrößen und die verbliebene Oberfläche in der Emulsion gemessen und mit denjenigen vor der Inkubation verglichen.

Bei den durch die Separation vom Plasma hervorgerufenen Veränderungen lag das Hauptaugenmerk auf der Oberfläche, da diese Variable, wie oben beschrieben, unmittelbar Einfluß auf die adsorbierten Proteine nehmen kann. Die meist nur geringen Veränderungen des $D(50\%)$, die bei einer Stabilitätsuntersuchung bereits auf Instabilitäten hinweisen würden, waren hier eher positiv zu bewerten, da ein sehr großer Teil der kleineren Partikel in den Emulsionen offensichtlich erhalten geblieben war, was wiederum für die volumenbezogene Oberfläche von großer Wichtigkeit war.

Tab. 10.2 /1: Teilchengrößen und volumenbezogene Oberflächen der Emulsionen vor Inkubation (v. Ink.) und nach der Separation vom Plasma (n. Sep.), gemessen mit dem Laserdiffraktometer, s. 4.3.2, (O_v [%] = Oberfläche n. Sep. / Oberfläche v. Ink.). Mittelwerte für 908 und 235 (n = 3) und 238 und 407 (n = 2), Einzelwerte im Anhang.

Emulsion mit	D (50%)		D (99%)		D max		O_v [m ² /cm ³]		O_v [%]
	v. Ink.	n. Sep.	v. Ink.	n. Sep.	v. Ink.	n. Sep.	v. Ink.	n. Sep.	
184	0,64	1,15	1,49	9,77	1,8	14,6	10,32	6,27	60,8
188	0,59	0,67	1,43	3,93	1,8	6,0	11,19	9,75	87,1
235	0,62	0,73	1,48	4,30	1,8	5,7	10,63	9,01	84,7
237	0,60	0,66	1,50	3,41	3,6	4,2	11,04	9,89	89,6
238	0,60	0,64	1,45	3,02	1,8	3,9	11,19	10,44	93,3
338	0,63	0,68	1,91	3,45	3,6	5,0	10,56	9,75	92,3
407	0,61	0,66	1,47	3,37	1,8	4,2	10,84	9,85	91,9
908	0,65	0,74	1,51	4,57	1,8	6,4	10,12	8,78	86,2

Drastische Veränderungen zeigten dagegen der $D(99\%)$ und der D_{max} , die verdeutlichten, daß es zu starker Koaleszenz und damit zur Bildung großer Teilchen gekommen war, was auf die Gesamtoberfläche jedoch nur einen kleinen Einfluß hatte. Sieben der untersuchten Emulsionen wiesen nach der Separation noch > 84 % der Oberfläche auf, die sie vor dem Versuch besessen hatten, einige sogar > 90 %. Dies wurde als gute Ausgangsposition für die Analytik der Proteinadsorption angesehen, eine vollständige Erhaltung der Oberfläche wird als unmöglich erachtet. Auffallend sind die stark abweichenden Werte der Emulsion, die mit Poloxamer 184 hergestellt worden war (E-184). Der $D(50\%)$ stieg wesentlich stärker an, und die Oberfläche verringerte sich auf < 61 % des ursprünglichen Wertes. Die volumenbezogene Oberfläche lag nur noch bei 6,3 m²/cm³, während die der übrigen Poloxamer-Emulsionen > 9 m²/cm³ waren, lediglich die mit Poloxamine 908 hergestellte lag mit 8,8 m²/cm³ knapp darunter.

10.2.2 Proteinadsorption

10.2.2.1 Unterschiedliche Adsorptionsmuster auf den Emulsionen

Es ergaben sich für alle Emulsionen Adsorptionsmuster, die geprägt waren von Apolipoproteinen. Zusätzlich traten auf einigen Emulsionen Transthyretin, Albumin und Immunglobulin G auf. Die Abb. 10.2 /1 zeigt

exemplarisch für vier Emulsionen die bereits aus dem vorigen Kapitel bekannte Region der Apolipoproteine.

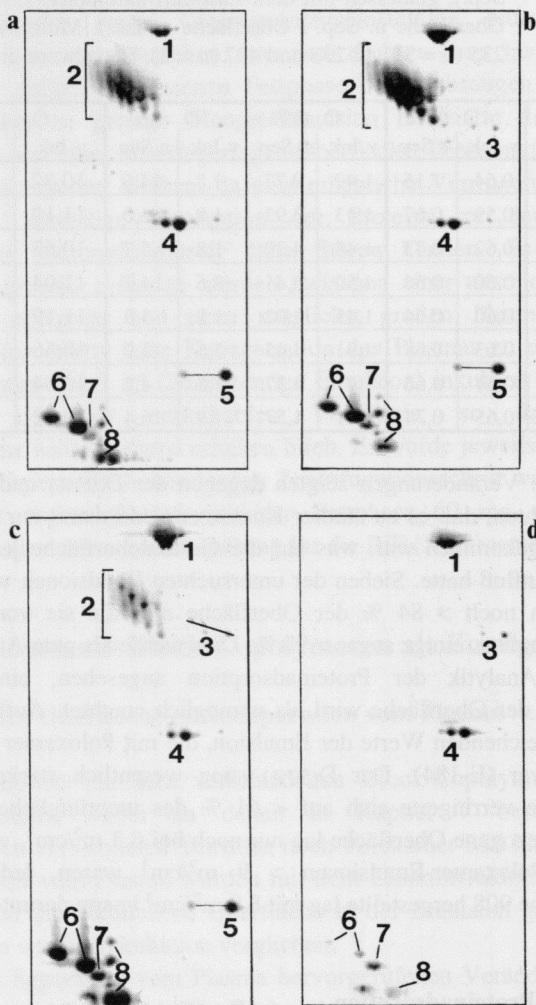


Abb. 10.2 /1: Ausschnitt der Proteinadsorptionsmuster auf (a) E-908, (b) E-238, (c) E-407, (d) E-235.

(1) ApoA-IV, (2) ApoJ, (3) ApoE, (4) ApoA-I, (5) Transthyretin, (6) ApoC-III, (7) ApoC-II, (8) ApoA-II. Abszisse: pI 4,4 - 6,0, nicht linearer Gradient, Ordinate: MG 6 - 46 kDa, nicht linearer Gradient.

Diese Ausschnitte zeigen bereits einerseits die starke qualitative Ähnlichkeit auf den meisten Gelen, andererseits aber auch deutliche Unterschiede in den Anteilen an der jeweiligen Gesamtmenge. In der Tab. 10.2 /2 sind die prozentualen Anteile der adsorbierten Proteine am Gesamtgel aufgeführt.

Tab. 10.2 /2: Prozentuale Anteile der adsorbierten Proteine an der Gesamtmenge.
(Mittelwerte für E-908, E-235: n = 3, für E-238, E-407: n = 2, s = Standardabweichung).

Protein	E-908		E-238		E-407		E-235	
	Anteil [%]	s	Anteil [%]	s	Anteil [%]	s	Anteil [%]	s
ApoA-I	23,6	9,36	5,2	1,56	4,7	0,64	25,6	8,30
ApoA-II	8,0	3,14	5,7	1,63	21,9	1,91	4,8	2,07
ApoA-IV	5,9	0,75	10,8	2,76	12,7	2,47	40,7	4,42
ApoC-II	3,2	2,82	2,9	2,12	4,3	1,27	10,6	6,43
ApoC-III	24,0	5,11	18,8	1,56	38,0	5,30	6,3	3,36
ApoE	0,1	0,08	0,2	0,28	0,3	0,28	2,6	1,25
ApoJ	19,2	9,75	42,7	1,91	8,6	3,75	0,0	0,00
Transthyretin	5,6	1,08	3,5	1,63	5,8	1,41	0,0	0,00
Albumin	6,7	2,81	8,2	1,06	2,0	1,08	0,0	0,00
IgG	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	4,2	0,6

Protein	E-184 Anteil [%]	E-188 Anteil [%]	E-237 Anteil [%]	E-338 Anteil [%]
ApoA-I	46,6	9,9	16,5	5,2
ApoA-II	0,3	2,5	5,0	5,7
ApoA-IV	22,9	6,6	27,6	10,8
ApoC-II	1,8	2,4	5,9	2,9
ApoC-III	3,8	17,1	25,1	18,8
ApoE	4,3	0,2	3,5	0,2
ApoJ	6,5	44,7	8,2	42,7
Transthyretin	0,1	6,6	1,6	3,5
Albumin	0,0	3,4	3,5	8,2
IgG	9,5	0,3	0,5	0,0

Mit der 2D-PAGE konnte demnach auch für Emulsionen gezeigt werden, daß eine unterschiedliche Oberflächenmodifizierung, hier erzeugt durch die Block-Copolymere als Emulgator auf den Emulsionströpfchen, eine unterschiedliche Proteinadsorption hervorruft. Auffällig war in den wiederholten Versuchen (Tab. 10.2 /2a) allgemein eine im Vergleich zu den Experimenten mit den Nanopartikeln höhere Streuung der prozentualen Anteile, insbesondere für E-908 und E-235. Besonders extrem war dabei ApoC-II, die starken Streuungen für ApoE sind vorrangig auf die sehr niedrigen Anteile zurückzuführen. Die allgemeine Tendenz zu stärkeren Streuungen deutet auf eine höhere Fluktuation der Proteine auf den Oberflächen hin, was durch zukünftige Kinetikstudien belegt werden könnte.

Der Gesamtanteil der Apolipoproteine belief sich auf fast allen Emulsionen auf > 83 % (Ausnahme: E-338: 71,5 %), auf E-235, -237 und -407 sogar auf > 90 %. Die allgemeine präferentielle Adsorption der Apolipoproteine an die Fetttröpfchen der Emulsion erscheint mit Blick auf ihre physiologische Funktion im Körper (s. 9.3.5) folgerichtig. Dabei dominierten unterschiedliche Proteine auf den verschiedenen Adsorptionsmustern, beispielsweise ApoA-I auf E-184, ApoA-IV auf E-235, ApoC-III auf E-407 und ApoJ auf E-188 und E-238. Die Emulsionen E-184 und E-235 besaßen als einzige nennenswerte prozentuale Anteile an IgG, während sie im Gegensatz zu allen anderen kein Transthyretin und Albumin adsorbierten.

10.2.2.2 Mögliche Korrelation mit der Block-Copolymer-Oberfläche

Aufgrund bestehender Modellvorstellungen konnten in Kapitel 7 Korrelationen der Proteinadsorption mit der Konformation der auf Nanopartikeln adsorbierten Poloxamere vorgenommen werden. Dies ist für die Emulsionen nicht ohne weiteres möglich, da hier aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Oberflächen (fest / flüssig - flüssig / flüssig) andere Gesetzmäßigkeiten erwartet werden und entsprechende detaillierte Kenntnisse über die Anordnung der Poloxamere in der O/W-Grenzfläche fehlen. Dennoch wurden erste Betrachtungen zu möglichen Korrelationen angestellt. Die Tabelle 10.2 /3 zeigt noch einmal die Kennzahlen der Poloxamere, erweitert um Poloxamer 338.

Tab. 10.2 /3: Verwendete Block-Copolymere und ihre Kennzahlen.

Poloxamer	Molekulargewicht	EO-Einheiten (n)	PO-Einheiten (m)	HLB-Wert
184	2900	13	30	15
235	4600	27	39	16
237	7700	62	35	24
188	8350	75	30	29
238	10800	97	39	28
338	14000	128	54	27
407	11500	98	67	22

Poloxamine				
908	25000	121	16	>24

Neben den oben gezeigten prozentualen Anteilen der Proteine wurden ebenfalls die absoluten Mengen (cpm) der adsorbierten Proteine betrachtet. Die Tabelle 10.2 /4 zeigt die Gesamtmengen der Proteine auf den verschiedenen Emulsionen.

Tab. 10.2 /4: Gesamtmengen der adsorbierten Proteine auf den Poloxamer-Emulsionen [cpm], zusätzlich sind die Verhältnisse der EO- und PO-Kettenlängen dargestellt.

	E-184	E-235	E-407	E-237	E-338	E-238	E-188	E-908
n EO /m PO	0,43	0,69	1,46	1,77	2,37	2,49	2,5	7,56
Proteinmenge gesamt [cpm]	1913	127 ± 50,3	533 ± 121,6	530	696	755 ± 12,7	975	551 ± 137,5

Auffällig waren zunächst einmal die geringe Adsorption auf E-235, die schon auf Abb. 10.2 /1 zu sehen war, und die vergleichsweise sehr große Proteinmenge auf E-184. Allein der Vergleich der Poloxamere 235 und 407 belegte, daß die Verhältnisse der Partikel nicht auf die Emulsionen übertragbar waren. Auf den PS 200 war durch die Modifikation mit Poloxamer 407 eine geringere Adsorption als durch Poloxamer 235 erreicht worden (7.1.4).

Es liegen Untersuchungen von Lee und Andrade (1988) vor zu den Oberflächeneigenschaften von PEO/PPO-Block-Copolymeren an der Luft/Wasser-Grenzfläche. Danach zeigt die Oberflächenspannung bei

gleicher Konzentration eine Abhängigkeit vom Verhältnis der EO- und PO-Kettenlängen, ein abnehmender Quotient (n_{EO} / m_{PO}) führt zu ebenfalls sinkender Oberflächenspannung. Dies wurde direkt korreliert mit der Verdrängung von Wassermolekülen in der Grenzfläche durch die Tensidmoleküle. Ebenso wurde es als Maß für die adsorbierte Menge in der Grenzfläche angesehen, d. h. ein niedriger Quotient (n_{EO} / m_{PO}) resultiert in einer hohen Menge Tensid in der Grenzfläche. Dies kann sich wiederum auf die Konformation der Tenside auswirken, die bei einer niedrigen Konzentration eher mit flach in der Grenzfläche ausgestreckten PEO- und PPO-Ketten vorliegen. Bei steigender Konzentration in der Grenzfläche werden sie dagegen zusammengeschoben, wobei die PPO-Ketten in die Luft ragen, während die PEO-Ketten sich in die Wasserphase strecken. Zusammengefaßt ist demnach ein niedriger Quotient (n_{EO} / m_{PO}) verantwortlich für eine dichte Packung der Block-Copolymere in der Grenzfläche.

In dem von Phillips (1992) vorgeschlagenen "Lipid-Compression"-Modell kommt es bei Adsorption von Proteinen in eine Phospholipid-Monoschicht an der Luft/Wasser-Grenzfläche zu einer Zusammenschiebung der Phospholipid-Moleküle, wobei sich der Oberflächendruck erhöht. Durch den von vornherein bestehenden Oberflächendruck kann die Proteinadsorption beeinflusst werden: Ein hoher Oberflächendruck (dichte Packung der Phospholipidmoleküle) ergibt eine geringe Proteinadsorption (Phillips, 1992).

Die Modellvorstellungen von Lee und Andrade (1988) und Phillips (1992) wurden hier auf die Anlagerung der Poloxamere auf die Grenzfläche Öl/Wasser übertragen. In der Tab. 10.2 /4 sind die Poloxamere bereits in aufsteigender Reihenfolge der Quotienten (n_{EO} / m_{PO}) aufgeführt. Mit der Ausnahme von E-184 ergaben sich steigende Gesamtmengen der adsorbierten Proteine. Offensichtlich wurde in der Tat durch den niedrigen Quotienten (n_{EO} / m_{PO}) auf E-235 eine derart hohe Packungsdichte erreicht, daß die Proteinadsorption minimiert wurde. Die Poloxamer-Moleküle lagen bereits so dicht beieinander, daß sie nur schwierig von sich nähernden Proteinen komprimiert werden konnten. Dagegen führten beispielsweise die geringeren Packungsdichten der Poloxamere 338 und 188 zu einer starken Proteinadsorption. Auf diese Weise werden auch die auf den ersten Blick paradox erscheinenden Mengenverhältnisse auf den E-235 und E-407 erklärbar (s.o.). Die beschriebene Abhängigkeit ist in Abb. 10.2 /2 graphisch dargestellt.

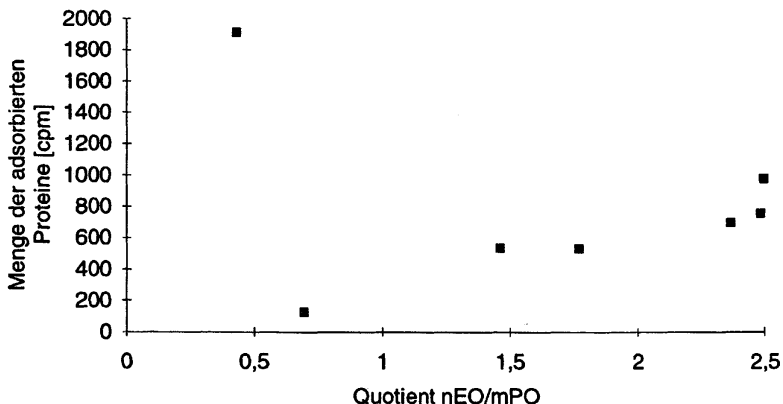


Abb. 10.2 /2: Abhängigkeit der Gesamtmenge der adsorbierten Proteine auf den verschiedenen Emulsionen vom Quotienten der PEO- und PPO-Kettenlängen.

Lediglich die mit Poloxamer 184 (Quotient (n EO / m PO): 0,43) hergestellte Emulsion weicht mit einer extrem hohen Proteinadsorption von der bisherigen Interpretation ab. Hier erlangt die unter 10.2.1 beschriebene Beobachtung bezüglich der Oberflächenveränderung während der Separation vom Plasma große Bedeutung. E-184 zeigte dort gegenüber den übrigen Emulsionen eine deutlich erhöhte Verkleinerung der Oberfläche. Zwar könnte man irrtümlicherweise annehmen, daß eine kleinere Oberfläche mit einer geringeren adsorbierten Proteinmenge assoziiert ist, diese Betrachtung verkennt allerdings die mögliche Ursache der geringen Oberfläche. Die Emulsion war offensichtlich gegenüber der Probenvorbereitung (Zentrifugation, Waschschrte) wesentlich anfälliger als die übrigen, was darauf zurückgeführt wird, daß die Einlagerung des Emulgators deutlich instabiler war als in den anderen Emulsionen. Dies wird mit den niedrigsten Kettenlängen (EO:13!) begründet. Aller Wahrscheinlichkeit nach fand demzufolge in dieser Emulsion eine verstärkte Verdrängung der Emulgators aus der Grenzfläche durch adsorbierende Proteine statt. Dies stellt eine Erklärung für beide beobachtete Phänomene dar, sowohl für die leichter zerstörbare Emulsion während der Probenvorbereitung (verringertes Emulgatorgehalt bzw. gestörter Emulgatorfilm in der Grenzfläche) als auch für die starke Proteinadsorption. Die geringe Stabilität der Emulgatoreinlagerung in die Grenzfläche aufgrund

zu geringer Kettenlängen führte hier trotz des niedrigen Quotienten (n_{EO}/m_{PO}) zu einer Ausnahme bezüglich der oben dargestellten Modellvorstellung.

Die gezeigte Abhängigkeit der Proteinadsorption vom Verhältnis der PEO- und PPO-Kettenlängen spiegelt sich bei der Betrachtung der einzelnen Proteine tendenziell nur für ApoJ und bedingt für Albumin und Transthyretin wider, wofür eine Begründung bisher nicht gegeben werden kann. Immunglobulin G adsorbierte in besonders hohem Maße auf E-184, was darauf hindeutet, daß eine starke Affinität zur Ölphase besteht, vorausgesetzt der Zugang ist nicht, wie in den anderen Emulsionen, durch stabilere Poloxamer-Packungen verwehrt. Weitere Korrelationen der Adsorption einzelner Proteine zu den Oberflächeneigenschaften der Emulsionen müssen Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

10.2.2.3 Vergleich der Proteinadsorption auf Emulsionen und Nanopartikeln

Die Ausführungen in 7.2.2 und 10.2.2.2 zeigen bereits, daß die Proteinadsorption auf Nanopartikeln und Emulsionen, modifiziert mit den gleichen Block-Copolymeren, von unterschiedlichen Gesetzmäßigkeiten beherrscht werden. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von einem Trägersystem auf ein anderes erscheint somit nicht zwangsläufig möglich.

Die Proteinadsorption auf den Emulsionen ist noch am ehesten mit der auf den 60 nm Polystyrol-Partikeln vergleichbar. Ohne aufgrund der Partikelverluste bei der Probenvorbereitung absolute quantitative Vergleiche anstellen zu können, kann man aufgrund der Erscheinung der gleichen Hauptproteine von ähnlichen Adsorptionsmustern auf den PS 60-407, PS 60-908, E-407 und E-908 sprechen. Im Gegensatz dazu zeigten die größeren Partikel eine abweichende Proteinadsorption (modifizierte PS 200 und PS 1000, Abschnitt 9.2), obwohl die Emulsionen hinsichtlich ihrer Größe (mittlerer Durchmesser 340 - 400 nm, PCS-Daten) diesen Partikeln ähnlicher waren. In den Emulsionen liegt aufgrund der oben beschriebenen Verhältnisse offensichtlich eine höhere Oberflächendichte der Poloxamere (PEO) vor als auf Polystyrol-Partikeln vergleichbarer Größe, was darin begründet ist, daß die PPO-Ketten in der Ölphase vorliegen und durch die veränderte Konformation weitere sich nähernde Poloxamer-Moleküle sich enger an die schon vorhandenen anlagern können. Erst auf den kleinen Polystyrol-Partikeln wird eine hohe PEO-Oberflächendichte erreicht, die in einer Proteinadsorption, die der auf den Emulsionen entspricht, resultiert.

Auch wenn für endgültige Aussagen insbesondere die Emulsionssysteme noch eingehender bezüglich Adsorptionskinetik und Spenderspezifität untersucht werden müssen und die vorhandenen Daten mit unterschiedlicher Plasmakonzentration (Partikel: 92 %, Emulsionen: 75 %) und zwangsläufig nach verschiedenen Zentrifugationszeiten erzielt wurden, soll hier dennoch ein erster Vergleich der prozentualen Anteile auf Partikeln und Emulsionen vorgenommen werden (Tab. 10.2 /5). Verwendet wurde für alle Proben das Plasma desselben Spenders.

Tab 10.2 /5: Vergleich der Proteinadsorption auf Polystyrol-Partikeln (60 nm) und Fettemulsionen, modifiziert bzw. hergestellt jeweils mit dem gleichen Block-Copolymer. (Gegenübergestellt sind die Daten aus Abb. 9.3 /2 und Tab. 10.2 /2.)

Protein	PS 60 -407		E-407		PS 60- 908		E-908	
	Anteil [%]	s	Anteil [%]	s	Anteil [%]	s	Anteil [%]	s
ApoA-I	12,5	2,57	4,7	0,64	13,2	3,19	23,6	9,36
ApoA-II	7,0	1,65	21,9	1,91	10,9	2,10	8,0	3,14
ApoA-IV	45,7	6,85	12,7	2,47	17,8	0,41	5,9	0,75
ApoC-II	9,3	1,98	4,3	1,27	10,9	1,65	3,2	2,82
ApoC-III	18,1	1,97	38,0	5,30	32,2	3,71	24,0	5,11
ApoE	3,8	2,65	0,3	0,28	0,4	0,08	0,1	0,08
ApoJ	1,0	0,54	8,6	3,75	12,5	1,76	19,2	9,75
Transthyretin	-	-	5,8	1,41	-	-	5,6	1,08
Albumin	-	-	2,0	1,08	-	-	6,7	2,81

Ein qualitativer Unterschied bestand bereits in der zusätzlichen Adsorption von Transthyretin und Albumin auf den Emulsionen. Für die beiden mit Poloxamer 407 modifizierten Systeme konnte bezüglich der prozentualen Anteile der Apolipoproteine kaum eine Ähnlichkeit festgestellt werden. So war beispielsweise ApoA-IV, das auf den Partikeln das Hauptprotein darstellte, auf den Emulsionströpfchen nur noch mit deutlich verringertem Anteil zu detektieren, während ApoC-III auf den Emulsionströpfchen den größten Anteil besaß. Die Ähnlichkeit zwischen PS 60-908 und E-908 war etwas stärker ausgeprägt, immerhin wurde das auf den Partikeln dominierende ApoC-III auch noch in einem relativ hohen Ausmaß auf den Emulsionströpfchen nachgewiesen. Ansonsten konnte auch hier nur wenig Gemeinsames detektiert werden. Sowohl die qualitativen als auch die quantitativen Unterschiede sind derart groß, daß dies nicht allein auf die

unterschiedliche Plasmakonzentration zurückgeführt wird. Die Übertragbarkeit der Adsorptionsmuster von Partikeln auf Emulsionen, modifiziert mit dem gleichen Block-Copolymer, scheint daher nach den bisherigen Erkenntnissen in der Tat nicht gegeben zu sein. Die am Anfang des Kapitels erwähnte Übereinstimmung des *In-vivo*-Verhaltens (Blutzirkulation) zweier unterschiedlicher Trägersysteme (Partikel und Emulsion), modifiziert mit dem gleichen Block-Copolymer (Poloxamine 908), erscheint demnach eher zufällig als zwangsläufig. Dennoch weisen die stark unterschiedlichen Adsorptionsmuster (Tab. 10.2 /2) auf den verschiedenen Block-Copolymer-Emulsionen auf gute Möglichkeiten zur Untersuchung des *In-vivo*-Verhaltens in Abhängigkeit von den adsorbierten Proteinen hin. Hier sollten weiterführende Experimente bezüglich der Proteinadsorption einschließlich assoziierter *In-vivo*-Studien weiteren Aufschluß bringen.

10.3 Zusammenfassung

Die 2D-PAGE-Analytik konnte einem weiteren Arzneistoffträgersystem, parenteralen Fetemulsionen, zugänglich gemacht werden. Durch entsprechende Zentrifugationsbedingungen gelang nach Inkubation in Plasma die Separation von Emulsionen, hergestellt mit Block-Copolymeren als Emulgator, so daß ein hoher Anteil der ursprünglichen Oberfläche der Emulsionen trotz mehrfacher Waschschrte erhalten blieb.

Die Adsorptionsmuster der Emulsionen zeigten jeweils einen hohen Anteil Apolipoproteine, wobei auf den verschiedenen Emulsionen unterschiedliche Hauptproteine (insbesondere A-I, A-IV, C-III und J) und stark differierende Mengenverhältnisse der einzelnen Proteine detektiert wurden. Des weiteren wurden auf den meisten Emulsionen Transthyretin und Albumin nachgewiesen, seltener IgG.

Die Untersuchungen von Lee und Andrade (1988) zur Anordnung von Block-Copolymeren in der Luft/Wasser-Grenzfläche und die Ausführungen zum "Lipid-Compression"-Modell von Phillips (1992) wurden auf die vorliegende Grenzfläche Öl/Wasser übertragen. Demnach resultiert ein niedriger Quotient (Kettenlänge EO / Kettenlänge PO) in einer hohen Menge Tensid in der Grenzfläche und einer engeren Zusammenlagerung der Block-Copolymere, was einerseits die EO-Ketten weiter in die Wasserphase ragen läßt, andererseits den Oberflächendruck erhöht. Ein höherer Oberflächendruck wird für eine höhere Proteinresistenz verantwortlich gemacht. In den präsentierten Experimenten wurde eine deutliche Abhängigkeit der Gesamtmenge der adsorbierten Proteine von dem

Quotienten ($n \text{ EO} / m \text{ PO}$) des verwendeten Poloxamers in Übereinstimmung mit den bestehenden Konzepten aufgezeigt. Die einzige Abweichung (Emulsion mit Poloxamer 184) konnte durch die Instabilität des Emulgatorfilms nach Proteinadsorption aufgrund der extrem kleinen Kettenlängen, auch im Zusammenhang mit den beobachteten Veränderungen während der Separation vom Plasma, erklärt werden. Korrelationen der Mengen einzelner Proteine sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Erste Vergleiche zwischen Emulsionen und Nanopartikeln, modifiziert mit den gleichen Block-Copolymeren, weisen darauf hin, daß eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von einem Trägersystem auf ein anderes nicht ohne weiters möglich ist. In Anbetracht der unterschiedlich gearteten Oberflächen (flüssig / flüssig - fest / flüssig) erscheint dies folgerichtig, zumal die dargelegten Ergebnisse unterschiedliche Gesetzmäßigkeiten für die Anordnung der Poloxamere und die davon abhängige Proteinadsorption belegen. Mit den Emulsionen bestehen aber offensichtlich gute Ansatzmöglichkeiten für die Untersuchung der Abhängigkeit des *In-vivo*-Verhaltens von den adsorbierten Proteinen, da durch die verschiedenen Emulgatoren eine große Bandbreite unterschiedlicher Verhältnisse der Apolipoproteine untereinander erzielt wurde.

11 Zusammenfassung der Arbeit

Gegenstand der Arbeit war die Untersuchung der Adsorption von Plasmaproteinen auf kolloidalen Arzneistoffträgern. Dabei wurde ein neuartiges Analyseverfahren etabliert und anschließend damit die Rolle der Plasmaproteine für das Drug Targeting untersucht.

Das *In-vivo*-Verhalten intravenös injizierter Trägersysteme ist durch deren physikochemische Eigenschaften allein nicht hinreichend erklärbar. Jedoch adsorbieren nach Injektion auf den Arzneistoffträgern in Abhängigkeit von ihrer Oberfläche bestimmte Plasmaproteine, die ihrerseits für das *In-vivo*-Verhalten verantwortlich sein können. In der vorliegenden Arbeit wurden erste Korrelationen zwischen den physikochemischen Eigenschaften und der Proteinadsorption etabliert, und es wurden Hinweise auf die Zusammenhänge von Proteinadsorption und *In-vivo*-Verhalten gefunden. Dies wird als Beitrag zu einer zukünftigen rationalen Entwicklung von Arzneistoffträgern für das Drug Targeting angesehen.

Zunächst wurde ein Verfahren zur Analytik der adsorbierten Plasmaproteine entwickelt. Polystyrol-Modellpartikel wurden *in vitro* in Humanplasma inkubiert und anschließend durch Zentrifugation bzw. Filtration vom Plasma getrennt. Die auf den Partikeln adsorbierten Proteine wurden desorbiert und mittels hochauflösender zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Dies ermöglichte die Identifizierung der einzelnen Proteine und resultierte in der detaillierten qualitativen und semi-quantitativen Aufklärung der Adsorptionsmuster. Methodische Aspekte unter besonderer Berücksichtigung der Einflüsse des Status des Plasmas (frisch / gefroren), der Plasmakonzentration, der Spenderspezifität und der Separationsmethode (Zentrifugation / Filtration) wurden ausführlich untersucht.

Polystyrol-Partikel wurden mit verschiedenen Block-Copolymeren aus der Reihe der Poloxamere bzw. mit Poloxamine 908 modifiziert. Gegenüber den reinen Polystyrol-Partikeln zeigten die modifizierten Partikel alle eine Reduktion der Proteinadsorption, dies jedoch in deutlich unterschiedlichem Ausmaß. Diese Unterschiede konnten nicht mit den herkömmlich verwendeten Oberflächencharakteristika der Partikel wie Überzugsschichtdicke und Hydrophobie korreliert werden. Daher wurde die Konformation der Polyethylenoxid(PEO)-Ketten der Poloxamere in die Betrachtungen einbezogen. Nach Verknüpfung der Proteinadsorptionstheorie auf PEO-Oberflächen nach Jeon et al. (1991) und dem Poloxamer-Adsorptionsmodell von Lee und Andrade (1988) konnten erste Korrelationen der Proteinadsorption mit den Oberflächenstrukturen der

Partikel aufgestellt werden, die sich auch im Vergleich modifizierter Partikel unterschiedlicher Größe bestätigten. Demnach ist insbesondere eine hohe PEO-Oberflächendichte für eine hohe Proteinresistenz der PEO-Oberfläche verantwortlich. Erst in zweiter Linie ist die PEO-Kettenlänge von Bedeutung. Dies kann nicht nur als ein experimenteller Beleg der Richtigkeit der Theorie von Jeon et al. angesehen werden, es ergeben sich darüber hinaus wertvolle Hinweise bezüglich der Entwicklung biologisch abbaubarer Arzneistoffträger, die mit PEO modifiziert sind.

Es wurden 60 nm Polystyrol-Partikel, modifiziert mit Poloxamer 407 (PS 60-407) bzw. Poloxamine 908 (PS 60-908) untersucht. Eine umfangreiche physikochemische Charakterisierung (Müller, 1991) hatte bisher keine Erklärung für das unterschiedliche *In-vivo*-Verhalten (Illum und Davis, 1987; Illum et al., 1987) der sehr ähnlichen Partikel liefern können. Erstmals konnten durch die Analytik der Proteinadsorption Unterschiede zwischen den beiden Partikeln gefunden werden, die eine mögliche Relevanz für das *In-vivo*-Verhalten besitzen. Für beide Partikel wurde eine alleinige Adsorption von Apolipoproteinen detektiert (A-I, A-II, A-IV, C-II, C-III, E und J). Während auf PS 60-407 ApoA-IV dominierte und ebenfalls eine größere Menge ApoE verzeichnet wurde, dominierte auf PS 60-908 ApoC-III, und es wurde eine größere Menge ApoJ detektiert. Untersuchungen der Adsorptionskinetik in Humanplasma und der Proteinadsorption in Kaninchenserum ergaben ebenfalls Unterschiede zwischen den Partikeln. Die dominante Adsorption der Apolipoproteine auf den Oberflächen mit vergleichsweise sehr hoher PEO-Oberflächendichte wurde auf der Grundlage ihres molekularen Aufbaus (amphipathische α -Helices) diskutiert. Unter Einbeziehung der in der Literatur beschriebenen physiologischen Funktion ergaben sich nach der Analyse der Proteinadsorption auf PS 60-908 und nach den Kinetikstudien Hinweise darauf, daß Apolipoprotein C-III möglicherweise für eine Umgehung des MPS verantwortlich sein kann.

Die Untersuchung der Proteinadsorption auf parenteralen Fettemulsionen, hergestellt mit den auch für die Partikelmodifikation verwendeten Block-Copolymeren, ergab ebenfalls eine deutliche präferentielle Adsorption der Apolipoproteine. Es zeigte sich jedoch, daß die Ergebnisse nicht ohne weiteres von einem Trägersystem auf ein anderes (Nanopartikel - Emulsionen) übertragbar sind. Dies konnte durch die unterschiedlichen Gesetzmäßigkeiten an den verschiedenartigen Grenzflächen (fest / flüssig - flüssig / flüssig) erklärt werden. Auf den Emulsionen konnte die Gesamtmenge der adsorbierten Proteine mit dem Quotienten aus Kettenlänge Polyethylenoxid / Kettenlänge Polypropylenoxid der Poloxamere korreliert werden.

12 Anhang

12.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die 2D-PAGE

12.1.1 Lösungen zur Proteinsolubilisation vor der IEF

- | | | |
|----|-------------------------|----------|
| 1) | SDS | 1,0 g |
| | DTE | 0,232 g |
| | Aqua bidest. | 10 ml |
| 2) | DTE | 0,1 g |
| | CHAPS | 0,4 g |
| | Harnstoff | 5,4 g |
| | Ampholine LKB pH 9 - 11 | 0,5 ml |
| | Aqua bidest. | ad 10 ml |

12.1.2 IEF-Gele

- | | | |
|----|--------------------------------|---------|
| 1) | CHAPS | 0,75 g |
| | NP 40 | 250 µl |
| | Aqua bidest. | 2,25 ml |
| 2) | Harnstoff | 25 g |
| | Acrylamid / PDA (30 % / 0,8 %) | 6,25 ml |
| | Aqua bidest. | 17,5 ml |
| | Ampholine BDH pH 4 - 8 | 1,5 ml |
| | Ampholine BDH pH 3,5 - 10 | 1 ml |
| | TEMED | 50 µl |
| | Lösung 1) | 2,5 ml |
| | Ammoniumpersulfat (10 %) | 40 µl |

12.1.3 Elektrodenpuffer IEF

Kathode:

NaOH (10 N)	1,68 ml
Aqua bidest.	700 ml

Anode:

Phosphorsäure (85 %)	2,35 ml
Aqua bidest.	3,4 l

12.1.4 Transfer-Puffer

SDS (10 %)	2,86 ml
TRIS-HCl pH 6,8 (0,5 M)	1,43 ml
Bromphenolblau (0,05 %)	0,57 ml
Aqua bidest.	ad 10 ml

12.1.5 SDS-PAGE-Gele

Gradient 9 - 16 % Acrylamid (Mengen für 9 Plattengele)

Lösung für 9 %:

TRIS-HCl pH 8,8	66,5 ml
Acrylamid / PDA (30 % / 0,8 %)	76 ml
Aqua bidest.	120,5 ml
Natriumthiosulfat (5 %)	1,3 ml
TEMED	100 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	1 ml

Lösung für 16 %:

TRIS-HCl pH 8,8	66,5 ml
Acrylamid / PDA (30 % / 0,8 %)	149 ml
Aqua bidest.	47,5 ml
Natriumthiosulfat (5 %)	1,3 ml
TEMED	100 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	1 ml

12.1.6 Elektrodenpuffer SDS-PAGE

SDS	2 g
Tris	12 g
Glycin	57,6 g
Aqua bidest.	ad 2000 ml

12.2 Verwendete Waschmedien in der Probenvorbereitung

12.2.1 Phosphatpuffer / NaCl pH 7,4

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	2,1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	19,1 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

12.2.2 Krebspuffer pH 7,4

NaCl	6,9 g
KCl	0,35 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,29 g
KH_2PO_4	0,16 g
Glucose	2,0 g
NaHCO_3	2,1 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,37 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

12.2.3 HEPES-Puffer pH 7,4

HEPES	11,92 g
NaOH	0,828 g
NaCl	4,634 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

12.3 Tabellen

12.3.1 Kap. 6.3, Abb. 6.3 /2

Untersuchung verschiedener Zentrifugationsschritte
(absolute Proteinmengen in cpm)

Protein	Freies Plasma + adsorbierte Proteine nach 1. Zentrifugation	Freies Plasma nach 1. Zentrifugation	Adsorbierte Proteine nach 5. Zentrifugation
Albumin	847,8	821,7	23,1
Fibrinogen α	186,3	2,9	193,3
Fibrinogen β	143,5	21,3	131,7
Fibrinogen γ	167,1	7,6	167,1
Fibrinogen ext. γ	21,3	2,3	15,2
Fibrinogen gesamt	518,2	34,1	507,3
PLS:6	93,2	0,4	94,0
α 1-Antitrypsin	84,1	76,2	0,9
Transferrin	74,3	74,1	0,7
Protein B	52,3	16,2	38,3
IgG γ	19,5	13,3	17,5
Haptoglobin β	9,7	7,5	0
Actin	8,2	9,0	1,1

12.3.2 Kap. 6.3, Abb. 6.3 /4

Vergleich von Zentrifugation und Filtration

(Proteinmengen in % der Gesamtmenge des Gels)

Protein	Proteine nach Zentrifugation	Proteine nach Filtration
Fibrinogen α	21,66	22,80
Fibrinogen β	21,95	21,11
Fibrinogen γ	19,87	21,64
Fibrinogen ext. γ	2,49	2,25
Fibrinogen gesamt	65,97	67,80
PLS:6	12,28	12,37
Protein B	7,02	6,23
α 2-Macroglobulin	2,23	2,92
Protein A	2,30	1,70
IgG γ	2,08	0,05
Albumin	1,31	1,46
ApoA-I	1,63	1,42
gesamt %	94,82	93,95

12.3.3 Kap. 6.4, zu Abb. 6.4 /3

Proteinadsorption aus den gefrorenen Plasmen unterschiedlicher Spender

(Proteinmengen in % der Gesamtmenge des Gels, \bar{x} = Mittelwert [%],
 s = Standardabweichung [%], v = Variationskoeffizient in %)

Protein	Spender A	Spender B	Spender C	Spender D	\bar{x}	s	v
Fibrinogen α	18,60	17,61	21,38	19,65	19,31	1,61	8,35
Fibrinogen β	17,26	20,66	17,98	17,79	18,42	1,52	8,76
Fibrinogen γ	20,73	18,38	20,74	18,43	19,57	1,35	6,87
Fibrinogen ext. γ	2,26	2,06	1,94	2,52	2,20	0,25	11,56
Fibrinogen gesamt	58,85	58,71	62,04	58,39	59,50	1,71	2,87
PLS:6	13,47	9,67	12,62	10,65	11,60	1,75	15,06
Protein B	1,80	5,73	8,78	7,31	5,91	3,01	50,92
α 2-Macroglobulin	3,93	3,27	3,21	3,55	3,49	0,33	9,42
IgG γ	3,07	4,23	2,01	3,15	3,12	0,91	29,11
Albumin	2,65	3,08	2,68	2,75	2,79	0,20	7,09
Protein A	1,20	1,44	2,06	1,38	1,52	0,37	24,62
ApoA-I	1,76	1,34	1,54	0,74	1,35	0,44	32,59
Plasminogen	0,25	0,52	0,51	0,46	0,44	0,13	28,99
C3 α	0,68	0,33	0,26	0,44	0,43	0,18	43,02
gesamt %	87,66	88,32	95,71	88,82	90,13	3,75	4,16

12.3.4 Kap. 6.4, zu Abb. 6.4 /5

Proteinadsorption aus unterschiedlich konzentriertem Plasma
(Proteinmengen in % der Gesamtmenge des Gels, pro Plasmakonzentration zwei Gele)

Protein	66prozentiges Plasma Probe 1	66prozentiges Plasma Probe 2	98prozentiges Plasma Probe 1	98prozentiges Plasma Probe 2
Fibrinogen α	18,27	20,26	17,77	17,16
Fibrinogen β	19,87	17,56	13,65	15,60
Fibrinogen γ	16,13	18,45	13,50	14,24
Fibrinogen ext. γ	2,01	1,79	1,65	1,34
Fibrinogen gesamt	56,28	58,06	46,57	48,34
PLS:6	12,40	10,62	20,68	19,78
Protein B	2,34	2,72	3,59	2,81
α 2-Macroglobulin	2,92	3,23	0,52	0,75
IgG γ	3,13	2,31	2,36	3,40
Albumin	2,42	2,91	3,20	2,54
ApoA-I	1,61	1,26	1,79	2,42
Protein A	1,72	1,51	1,76	1,69
Plasminogen	0,56	0,51	0,54	0,77
C3 α	0,52	0,39	0,42	0,23
gesamt %	83,90	83,52	81,43	82,73

12.3.5 Kap. 9.3, Abb. 9.3 /2

Proteinadsorption auf PS 60-407 und PS 60-908

(Proteinmengen in % der Gesamtmenge der Gele, x = Mittelwert [%],
s = Standardabweichung [%], v = Variationskoeffizient in %)

Protein	PS 60-407 (n=6)			PS 60-908 (n=3)		
	x	s	v	x	s	v
ApoA-I	12,52	2,57	20,53	13,16	3,19	24,24
ApoA-II	6,96	1,65	23,71	10,94	2,10	19,21
ApoA-IV	45,65	6,85	15,02	17,83	0,41	2,30
ApoC-II	9,30	1,98	21,31	10,89	1,65	15,19
ApoC-III	18,05	1,97	10,90	32,16	3,71	11,55
ApoE	3,84	2,65	69,06	0,39	0,08	20,20
ApoJ	1,01	0,54	53,47	12,54	1,76	14,05
gesamt %	97,31	1,01	1,01	97,89	0,18	0,19

12.3.6 Kap. 10.3, zu Tab. 10.2 /1

Teilchengrößen und volumenbezogene Oberflächen der Emulsionen

Teilchengrößen und volumenbezogene Oberflächen der Emulsionen vor Inkubation (v. Ink.) und nach der Separation vom Plasma (n. Sep.), gemessen mit dem Laserdiffraktometer, s. 4.3.2 (Ov [%] = Oberfläche n. Sep. / Oberfläche v. Ink.), Einzelwerte der mehrfach untersuchten Emulsionen.

Emulsion mit	D (50%)		D (99%)		D max		Ov [m^2/cm^3]		Ov [%]
	v. Ink.	n. Sep.	v. Ink.	n. Sep.	v. Ink.	n. Sep.	v. Ink.	n. Sep.	
235	0,62	0,79	1,48	5,98	1,8	8,6	10,62	8,37	78,8
	0,62	0,70	1,48	3,48	1,8	4,2	10,65	9,35	87,5
	0,62	0,69	1,47	3,44	1,8	4,2	10,63	9,31	87,6
238	0,59	0,64	1,43	2,82	1,80	3,60	11,21	10,37	92,5
	0,60	0,63	1,46	3,22	1,8	4,2	11,16	10,50	94,1
407	0,61	0,65	1,45	3,11	1,8	4,2	10,87	10,08	92,7
	0,61	0,67	1,48	3,37	1,8	4,2	10,81	9,85	91,1
908	0,65	0,78	1,52	4,47	1,8	7,2	10,19	8,16	78,3
	0,64	0,71	1,51	3,84	1,8	6,0	10,09	9,23	91,5
	0,65	0,73	1,51	3,89	1,8	6,0	10,07	8,94	88,8

13 Literaturverzeichnis

Aalto-Setälä, K., Fisher, E.A., Chen, X., Chajek Shaul, T., Hayek, T., Zechner, R., Walsh, A., Ramakrishnan, R., Ginsberg, H.N. und Breslow, J.N., Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles, *J. Clin. Invest.* 90, 1889-1900 (1992).

Akasaka, Y., Ueda, H., Takayama, K., Machida, Y. und Nagai, T., Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanospheres coated with monoclonal antibodies, *Drug Design Deliv.* 3, 85-97 (1988).

Allen, T.M., The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13, 285-309 (1994).

Allen, T.M., Hansen, C. und Rutledge, J., Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues, *Biochim. Biophys. Acta* 981, 27-35 (1989).

Altieri, D.C., Mannuccio, P.M. und Capitanio, A.M., Binding of fibrinogen to human monocytes, *J. Clin. Invest.* 78, 968-976 (1986).

Amiji, M. und Park, K., Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers, *Biomaterials* 13, 682-692 (1992).

Anderson, N.L. und Anderson, N.G., A two-dimensional gel database of human plasma proteins, *Electrophoresis* 12, 883-906 (1991).

Andrade, J.D., Principles of protein adsorption, in *Protein Adsorption*, Andrade, J.D., Hrsg. (Plenum Press, New York, 1985), S. 1-89.

Andrade, J.D., Hlady, V., Wei, A.-P., Ho, C.-H., Lea, A.S., Jeon, S.I., Lin, Y.S. und Stroup, E., Proteins at interfaces: Principles, multivariate aspects, protein resistant surfaces, and direct imaging and manipulation of adsorbed proteins, *Clin. Mater.* 11, 67-84 (1992).

Andreesen, R., Osterlaz, J., Bodemann, H.H., Bross, K.J., Costabel, U. und Löhr, G.W., Expression of transferrin receptors and intracellular ferritin during terminal differentiation of human monocytes, *Blut* 49, 195-202 (1984).

Appel, R.D., Hochstrasser, D.F., Funk, M., Vargas, J.R., Pellegrini, C., Muller, A.F. und Scherrer, J.-R., The MELANIE project: From a biopsy to automatic protein map interpretation by computer, *Electrophoresis* 12, 722-735 (1991).

Appel, R.D., Sanchez, J.-C., Bairoch, A., Golaz, O., Miu, M., Vargas, J.R. und Hochstrasser, D.F., SWISS-2D-PAGE: A database of two-dimensional gel electrophoresis images, *Electrophoresis* 14, 1232-1238 (1993).

- Artursson, P. und Sjöholm, I., Effect of opsonins on the macrophage uptake of polyacrylstarch microparticles, *Int. J. Pharm.* 32, 165-170 (1986).
- Asakura, T., Ohnishi, T., Friedman, S. und Schwartz, E., Abnormal precipitation of oxyhemoglobin S by mechanical shaking (denaturation/vaso-occlusion/sickle cell disease/ethanol/methylethyl ketone), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 1594-1598 (1974).
- Bale, M.D., Mosher, D.F., Wolfarht, L. und Sutton, R.C., Competitive adsorption of fibronectin, immunoglobulin, albumin, and bulk plasma proteins on polystyrene latex, *J. Coll. Interf. Sci.* 125, 516-525 (1988).
- Bantjes, A., Breemhaar, W., Beugeling, T., Brinkman, E. und Ellens, D.J., Preferential adsorption of high density lipoprotein (HDL) in blood plasma/polymer interaction, *Makromol. Chem. Suppl.* 9, 99-102 (1985).
- Becker, S., Functions of the human mononuclear phagocyte system - a condensed review, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 3, 1-100 (1988).
- Beisiegel, U., Apolipoproteins as ligands for lipoprotein receptors, in *Structure and Function of Apolipoproteins*, Rosseneu, M., Hrsg. (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992) S. 269-294.
- Bergström, K., Holmberg, K., Safranj, A., Hoffman, A.S., Edgell, M.J., Kozlowski, A., Hovanes, B.A. und Harris, J.M., Reduction of fibrinogen adsorption on PEG-coated polystyrene surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 779-790 (1992).
- Birdi, K.S., Spread monolayer films of proteins at the air-water interface, *J. Coll. Interf. Sci.* 43, 545-547 (1973).
- Blume, G. und Cevc, G., Liposomes for the sustained drug release in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 91-97 (1990).
- Blunk, T., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.-C., Müller, B.W. und Müller, R.H., Colloidal carriers for intravenous drug targeting: Plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, *Electrophoresis* 14, 1382-1387 (1993).
- Blunk, T. und Müller, R.H., Uptake of charged serum components as a selection criterion for in vivo drug carriers avoiding liver / spleen uptake, *Arch. Pharm.* 321, 755 (1989).
- Bock, T.K., *Emulsionen als parenterale Arzneistoffträgersysteme - Herstellung, Charakterisierung und Optimierung*, Dissertation (Christian-Albrechts-Universität, Kiel 1994).
- Bohnert, J.L. und Horbett, T.A., Changes in adsorbed fibrinogen and albumin interactions with polymers indicated by decreases in detergent elutability, *J. Coll. Interf. Sci.* 111, 363-377 (1986).

- Boisson-Vidal, C., Jozefonvicz, J. und Brash, J.L., Interactions of proteins in human plasma with modified polystyrene resins, *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 67-84 (1991).
- Brash, J.L., Protein adsorption at the solid-solution interface in relation to blood-material interactions, in *Proteins at Interfaces*, Brash, J.L. und Horbett, T.A., Hrsg. (Am. Chem. Soc., Washington D.C., 1987), S. 490-506.
- Brash, J.L. und ten Hove, P., Effect of plasma dilution of adsorption of fibrinogen to solid surfaces, *Thromb. Haemostas.* 51, 326-330 (1984).
- Brash, J.L. und Thibodeau, J.A., Identification of proteins adsorbed from human plasma to glass bead columns: plasmin-induced degradation of adsorbed fibrinogen, *J. Biomed. Mater. Res.* 20, 1263-1275 (1986).
- Breemhaar, W., Brinkman, E., Ellens, D.J., Beugeling, T. und Bantjes, A., Preferential adsorption of high density lipoprotein from blood plasma onto biomaterial surfaces, *Biomaterials* 5, 269-274 (1984).
- Bunville, L.G., Commercial instrumentation for particle size analysis, in *Modern Methods of Particle Size Analysis*, Barth, H.G., Hrsg. (Wiley & Sons, New York, 1984), S. 1-42.
- Carpentier, Y.A., Intravascular metabolism of fat emulsions: The Arvid Wretling Lecture, Espen 1988, *Clin. Nutr.* 8, 115-125 (1989).
- Cook, B.C. und Retzinger, G.S., Elution of fibrinogen and other plasma proteins from unmodified and from lecithin-coated polystyrene-divinylbenzene beads, *J. Coll. Interf. Sci.* 153, 1-12 (1992).
- Cornelius, R.M. und Brash, J.L., Identification of proteins adsorbed to hemodialyser membranes from heparinized plasma, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 4, 291-304 (1993).
- Couvreux, P., Fattal, E. und Andremont, A., Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections, *Pharm. Res.* 8, 1079-1086 (1991).
- Cuyper, P.A., Hermens, W.T. und Hemker, H.C., Ellipsometric study of protein film on chromium, *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* 283, 77-84 (1977).
- Davis, S.S. und Hansrani, P., The influence of emulsifying agents on the phagocytosis of lipid emulsions by macrophages, *Int. J. Pharm.* 23, 69-77 (1985).
- Davis, S.S. und Illum, L., Colloidal carriers and drug targeting, *Acta Pharm. Technol.* 32, 4-9 (1986).
- Davis, S.S., Illum, L., Moghimi, S.M., Davies, M.C., Porter, C.J.H., Muir, I.S., Brindley, A., Christy, N.M., Norman, M.E., Williams, P. und Dunn, S.E., Microspheres for targeting drugs to specific body sites, *J. Control. Rel.* 24, 157-163 (1993).
- Desai, N.P. und Hubbell, J.A., Biological responses to polyethylene oxide modified polyethylene terephthalate surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 829-843 (1991).

Diederichs, J.E., *Surfactant-Liposome zur Behandlung des IRDS - Charakterisierung und Scaling-Up*, Dissertation (Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1993).

Dunn, M.J. und Burghes, A.H.M., High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis I. Methodological procedures, *Electrophoresis* 4, 97-116 (1983a).

Dunn, M.J. und Burghes, A.H.M., High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis II. Analysis and applications, *Electrophoresis* 4, 173-189 (1983b).

Elbaum, D., Harrington, J., Roth, Jr., E.F. und Nagel, R.L., Surface activity of hemoglobin S and other human hemoglobin variants, *Biochim. Biophys. Acta* 427, 57-69 (1976).

Elgersma, A.V., Zsom, R.L.J., Norde, W. und Lyklema, J., The adsorption of bovine serum albumin on positively and negatively charged polystyrene latices, *J. Coll. Interf. Sci.* 138, 145-156 (1990).

Elgersma, A.V., Zsom, R.L.J., Norde, W. und Lyklema, J., The adsorption of different types of monoclonal immunoglobulin on positively and negatively charged polystyrene latices, *Coll. Surf.* 54, 89-101 (1991).

Ertel, S.I., Ratner, B.D. und Horbett, T.A., The adsorption and elutability of albumin, IgG, and fibronectin on radiofrequency plasma deposited polystyrene, *J. Coll. Interf. Sci.* 147, 433-442 (1991).

Fidler, I.J. und Hart, I.R., Biological diversity in metastatic neoplasms: Origins and implications, *Science* 217, 998-1003 (1982).

Gabizon, A. und Papahadjopoulos, D., Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85, 6949-6953 (1988).

Golaz, O., Hughes, G.J., Frutiger, S., Paquet, N., Bairoch, A., Pasquali, C., Sanchez, J.-C., Tissot, J.-D., Appel, R.D., Walzer, C., Balant, L. und Hochstrasser, D.F., Plasma and red blood cell protein maps: Update 1993, *Electrophoresis* 14, 1223-1231 (1993).

Gombotz, W.R., Guanghui, W., Horbett, T.A. und Hoffman A.S., Protein adsorption to and elution from polyether surfaces, in *Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Harris, J.M., Hrsg. (Plenum Press, New York, 1992), S. 247-261.

Gombotz, W.R., Guanghui, W., Horbett, T.A. und Hoffman, A.S., Protein adsorption to poly (ethylene oxide) surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 1547-1562 (1991).

- Gordon, S., Perry, V.H., Rabinowitz, S., Chung, L.-P. und Rosen, H., Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system, in *Macrophage Plasma Membrane Receptors: Structure and Function*, Gordon, S., Hrsg. (J. Cell. Sci., Suppl. 9, Company of Biologists Limited, Cambridge, 1988) S. 1-27.
- Görg, A., Postel, W. und Günther, S., The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients (A review), *Electrophoresis* 9, 531-546 (1988).
- Grainger, D.W., Okano, T. und Kim, S.W., Protein adsorption from buffer and plasma onto hydrophilic-hydrophobic poly (ethylene oxide) - polystyrene multiblock copolymers, *J. Coll. Interf. Sci.* 132, 161-175 (1989).
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V. und Langer, R., Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres, *Science* 263, 1600-1603 (1994).
- Gudewicz, P.W., Molnar, J., Lai, M.Z., Beezhold, D.W., Sieftring, G.E., Ofedo, R.B. und Lorand, L., Fibronectin-mediated uptake of gelatin-coated latex particles by peritoneal macrophages, *J. Cell. Biol.* 87, 427-433 (1980).
- Gupta, P.K. und Hung, C.T., Targeted delivery of low dose doxorubicin hydrochloride administered via magnetic albumin microspheres in rats, *J. Microencaps.* 7, 85-94 (1990).
- Gurr, M.I. und Harwood, J.L., *Lipid Biochemistry* (Chapman & Hall, London, 1991).
- Heukeshoven, J. und Dernick, R., Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining, *Electrophoresis* 6, 103-112 (1985).
- Ho, C-H., Hlady, V., Nyquist, G., Andrade, J.D. und Caldwell, K.D., Interaction of plasma proteins with heparinized gel particles studied by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis, *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 423-441 (1991).
- Hochstrasser, A.-C., James, R.W., Martin, B.M., Harrington, M., Hochstrasser, D., Pometta, D. und Merrill, C., HDL particle associated proteins in plasma and cerebrospinal fluid: Identification and partial sequencing, *Appl. Theor. Electrophoresis* 1, 73-76 (1988).
- Hochstrasser, D.F. und Merrill, C.R., 'Catalysts' for polyacrylamide gel polymerization and detection of proteins by silver staining, *Appl. Theor. Electrophoresis* 1, 35-40 (1988).
- Hochstrasser, D.F., Harrington, M.G., Hochstrasser, A.-C., Miller, M.J. und Merrill, C.R., Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis, *Anal. Biochem.* 173, 424-435 (1988a).
- Hochstrasser, D.F., Patchornik, A. und Merrill, C.R., Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining, *Anal. Biochem.* 173, 412-423 (1988b).

Horbett, T.A., Adsorption to biomaterials from protein mixtures, in *Proteins at Interfaces*, Brash, J.L. und Horbett, T.A., Hrsg. (Am. Chem. Soc., Washington D.C., 1987), S. 239-260.

Horbett, T.A. und Brash, J.L., Proteins at interfaces: Current issues and future prospects, in *Proteins at Interfaces*, Brash, J.L. und Horbett, T.A., Hrsg. (Am. Chem. Soc., Washington D.C., 1987), S. 1-33.

Horbett, T.A. und Weathersby, P.K., Adsorption of proteins from plasma to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers. I. Analysis with the in situ radioiodination technique, J. Biomed. Mater. Res. 15, 403-423 (1981).

Hsu, J.J. und Juliano, R.L., Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system. II. Nonspecific and receptor mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages, Biochim. Biophys. Acta 720, 411-419 (1982).

Hu, D.S.-G., Liu, H.-J. und Pan, I.-L., Inhibition of bovine serum albumin adsorption by poly (ethylene glycol) soft segment in biodegradable poly (ethylene glycol / poly (L- lactide)) copolymers, J. Appl. Polym. Sci. 50, 1391-1396 (1993).

Ibrahim, A., Couvreur, P., Roland, M. und Speiser, P., New magnetic drug carrier, J. Pharm. Pharmacol. 35, 59-61 (1982).

Illum, L. und Davis, S.S., Targeting of colloidal particles to the bone marrow, Life Sci. 40, 1553-1560 (1987).

Illum, L., Davis, S.S., Müller, R.H., Mak, E. und West, P., The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a blockpolymer - poloxamine 908, Life Sci. 40, 367-374 (1987).

Illum, L., Jones, P.D.E., Baldwin, R.W. und Davis, S.S., Tissue distribution of poly (hexyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles coated with monoclonal antibodies in mice bearing human tumor xenografts, J. Pharmacol. Exp. Ther. 230, 733-736 (1984).

Illum, L., Jones, P.D.E., Kreuter, J., Baldwin, R.W. und Davis, S.S., Adsorption of monoclonal antibodies to polyhexylcyanoacrylate nanoparticles and subsequent immunospecific binding to tumor cells in vitro, Int. J. Pharm. 17, 54-76 (1983).

Illum, L., Thomas, N.W. und Davis, S.S., Effect of a suppression of the reticuloendothelial system on the distribution of model carrier particles, J. Pharm. Sci. 75, 16-22 (1986).

Illum, L., West, P., Washington, C. und Davis, S.S., The effect of stabilising agents on the organ distribution of lipid emulsions, Int. J. Pharm. 54, 41-49 (1989).

Jeon, S.I. und Andrade, J.D., Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide, II. Effect of protein size, J. Coll. Interf. Sci. 142, 159-166 (1991).

- Jeon, S.I., Lee, J.H., Andrade, J.D. und De Gennes, P.G., Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide, I. Simplified theory, J. Coll. Interf. Sci. 142, 149-158 (1991).
- Jeppsson, R. und Rössner, S., The influence of emulsifying agents and of lipid soluble drugs on the fractional removal rate of lipid emulsions from the blood stream of the rabbit, Acta Pharmacol. et Toxicol. 37, 134-144 (1975).
- Jönsson, U., Ivarsson, B., Lundström, I. und Berghem, L., Adsorption behavior of fibronectin on well-characterized silica surfaces, J. Coll. Interf. Sci. 90, 148-163 (1982).
- Juliano, R.L., Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions, Adv. Drug Deliv. Rev. 2, 31-54 (1988).
- Kaplan, J. und Neilsen, M.L., Analysis of macrophage surface receptors. (I) Binding of α -macroglobulin-protease complexes to rabbit alveolar macrophages J. Biol. Chem. 254, 7323-7328 (1979).
- Karlson, P., *Kurzes Lehrbuch der Biochemie* (Thieme Verlag, Stuttgart, 1994).
- Kazatchkine, M.D. und Carreno, M.P., Activation of the complement system at the interface between blood and artificial surfaces, Biomaterials 9, 30-35 (1988).
- Kochwa, S., Litwak, R.S. und Rosenfield, R.E., Blood elements at foreign surfaces: A biochemical approach to the adsorption of plasma proteins, Ann. N.Y. Acad. Sci. 283, 37-49 (1977).
- Kossovsky, N., Feng, D., Millett, D. und Campbell, P.A., Human plasma adsorption to particulate arthroplastic component materials in vitro, ASTM Spec. Tech. Publ., STP 1144, 150-159 (1992).
- Koutsoukos, P.G., Norde, W. und Lyklema, J., Protein adsorption on hematite (α -Fe₂O₃) surfaces, J. Coll. Interf. Sci. 95, 385-397 (1983).
- Kreuter, J. und Borchard, G., Interaction of serum albumin components with nanoparticles and the resulting body distribution after intravenous injection to rats, Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater. 19, 166-167 (1992).
- Labarre, D., Montdargent, B., Carreno, M.-P. und Maillat, F., Strategy for in vitro evaluation of the interactions between biomaterials and complement systems, J. Appl. Biomater. 4, 231-240 (1993).
- Lee, J., Martic, P.A. und Tan, J.S., Protein adsorption on pluronic copolymer-coated polystyrene particles, J. Coll. Interf. Sci. 131, 252-266 (1989).
- Lee, J.H. und Andrade, J.D., Surface properties of aqueous PEO/PPO block copolymer surfactants, in *Polymer Surface Dynamics*, Andrade, J.D., Hrsg. (Plenum Press, New York, 1988), S.119-136.
- Lee, J.H., Kopecek, J. und Andrade, J.D., Protein-resistant surfaces prepared by PEO-containing block copolymer surfactants, J. Biomed. Mater. Res. 23, 351-368 (1989).

Lee, J.H., Kopeckova, P., Kopecek, J. und Andrade, J.D., Surface properties of copolymers of alkyl methacrylates with methoxy (polyethylene oxide) methacrylates and their application as protein-resistant coatings, *Biomaterials* 11, 455-464 (1990).

Lee, R.G., Adamson, C. und Kim, S.W., Competitive adsorption of plasma proteins onto polymer surfaces, *Thromb. Res.* 4, 485-490 (1974).

Lemkin, P.F. und Lipkin, L.E., GELLAB: A computer system for 2D gel electrophoresis analysis, I. Segmentation of spots and system preliminaries, *Comp. Biomed. Res.* 14, 272-297 (1981).

Lensen, H.G.W., Bargeman, D., Bergveld, P., Smolders, C.A. und Feijen, J., High-performance liquid chromatography as a technique to measure the competitive adsorption of plasma proteins onto latices, *J. Coll. Interf. Sci.* 99, 1-8 (1984).

Lensen, H.G.W., Breemhaar, W., Smolders, C.A. und Feijen, J., Competitive adsorption of plasma proteins at solid-liquid interfaces, *J. Chromatogr.* 376, 191-198 (1986).

Lok, B.K., Cheng, Y.-L. und Robertson, C.R., Total internal reflection fluorescence: A technique for examining interactions of macromolecules with solid surfaces, *J. Coll. Interf. Sci.* 91, 87-103 (1983).

Lucks, J.-S., *Parenterale Fetteemulsionen als Arzneistoffträger - Herstellung, Charakterisierung und Stabilität*, Dissertation (Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1993).

MacRitchie, F., The adsorption of proteins at the solid/liquid interface, *J. Coll. Interf. Sci.* 38, 484-488 (1972).

Mehta, K., Juliano, R.L. und Lopez-Berestein, G., Stimulation of macrophage protease secretion via liposomal delivery of muramyl dipeptide derivatives to intracellular sites, *Immunology* 51, 517-527 (1984).

Merril, C.R., Detection of proteins separated by electrophoresis, in *Advances in Electrophoresis Vol I*, Chrambach, A., Dunn, M.J., Radola, B.J., Hrsg. (VCH, New York, 1987), S. 111-139.

Merril, C.R., Goldman, D. und Van Keuren, M.L., Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 3, 17-23 (1982).

Merril, C.R., Switzer, R.C. und Van Keuren, M.L., Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 4335-4339 (1979).

Miller, M.J., Computer-assisted analysis of two-dimensional gel electrophoretograms, in *Advances in Electrophoresis, Vol. 3*, Chrambach, A., Dunn, M.J., Radola, B.J., Hrsg. (VCH, Weinheim/New York, 1989), S. 182-215.

- Moghimi, S.M. und Patel, H.M., Differential properties of organ-specific serum opsonins for liver and spleen macrophages, *Biochim. Biophys. Acta* 984, 379-383 (1989a).
- Moghimi, S.M. und Patel, H.M., Serum opsonins and phagocytosis of saturated and unsaturated phospholipid liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 984, 384-387 (1989b).
- Moghimi, S.M. und Patel, H.M., Tissue specific opsonins for phagocytic cells and their different affinity for cholesterol-rich liposomes, *FEBS Lett.* 233, 143-147 (1988).
- Müller, B.W. und Müller, R.H., Bestimmung von mittleren Durchmessern und Größenverteilungen an Teilchen im submikroskopischen Bereich mit der Photonenkorrelationsspektroskopie, *Pharm. Ind.* 45, 1150-1153 (1983).
- Müller, R.H., *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting*, (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1991).
- Müller, R.H. und Heinemann, S., Surface modelling of microparticles as parenteral systems with high tissue affinity, in *Bioadhesion - Possibilities and Future Trends*, Gurny, R., Junginger, H.E., Hrsg. (WVG, Stuttgart, 1989), S. 202-213.
- Mulzer, S.R. und Brash, J.L., Analysis of proteins adsorbed to glass from human plasma using immunoblotting methods, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 1, 173-182 (1990).
- Nässander, U.K., Storm, G., Peeters, P.A.M. und Crommelin, D.J.A., Liposomes, in *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, Chasin, M. und Langer, R., Hrsg. (Marcel Dekker, N.Y. 1990), S.261-338.
- Norde, W., Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface, *Adv. Coll. Interf. Sci.* 25, 267-340 (1986).
- Norde, W. und Lyklema, J., The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces, I. Adsorption isotherms. Effects of charge, ionic strength, and temperature, *J. Coll. Interf. Sci.* 66, 257-265 (1978a).
- Norde, W. und Lyklema, J., The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces, II. Hydrogen ion titrations, *J. Coll. Interf. Sci.* 66, 266-276 (1978b).
- Norde, W. und Lyklema, J., The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces, III. Electrophoresis, *J. Coll. Interf. Sci.* 66, 277-284 (1978c).
- Norde, W. und Lyklema, J., The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces, IV. The charge distribution in the adsorbed state, *J. Coll. Interf. Sci.* 66, 285-294 (1978d).

- Norde, W. und Lyklema, J., The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces, V. Microcalorimetry, J. Coll. Interf. Sci. 66, 295-302 (1978e).
- Norde, W., Fraaye, J.G.E.M. und Lyklema, J., Protein adsorption at solid-liquid interfaces: A colloid-chemical approach, in *Proteins at Interfaces*, Brash, J.L. und Horbett, T.A., Hrsg. (Am. Chem. Soc., Washington D.C., 1987), S. 36-47.
- Norde, W., MacRitchie, F., Nowicka, G. und Lyklema, J., Protein adsorption at solid-liquid interfaces: Reversibility and conformation aspects, J. Coll. Interf. Sci. 112, 447-456 (1986).
- Norman, M.E., Williams, P. und Illum, L., Human serum albumin as a probe for surface conditioning (opsonization) of block copolymer-coated microspheres, Biomaterials 13, 841-849 (1992).
- Norman, M.E., Williams, P. und Illum, L., Influence of block copolymers on the adsorption of plasma proteins to microspheres, Biomaterials 14, 193-202 (1993a).
- Norman, M.E., Williams, P. und Illum, L., In vivo evaluation of protein adsorption to sterically stabilised colloidal carriers, J. Biomed. Mater. Res. 27, 861-866 (1993b).
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R. und Morris, N.R., A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels, Anal. Biochem. 105, 361-363 (1980).
- O'Farrell, P.H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, J. Biol. Chem. 250, 4007-4021 (1975).
- Ohnishi, T. und Asakura, T., Denaturation of oxyhemoglobin S by mechanical shaking, Biochim. Biophys. Acta 453, 93-100 (1976).
- Olson, A.D. und Miller, M.J., Elsie 4: Quantitative computer analysis of sets of two-dimensional gel electrophoretograms, Anal. Biochem. 169, 49-70 (1988).
- O'Mullane, J.E., Artursson, P. und Tomlinson, E., Biopharmaceutics of microparticulate drug carriers, Ann. N.Y. Acad. Sci. 507, 100-140 (1987).
- O'Mullane, J.E., Davison, C.J., Petrak, K. und Tomlinson, E., Adsorption of fibrinogen on to polystyrene latex coated with the non-ionic surfactant, poloxamer 338, Biomaterials 9, 203-204 (1988).
- Parzer, S., Balcke, P. und Mannhalter, C., Plasma protein adsorption to hemodialysis membranes: Studies in an in vitro model, J. Biomed. Mater. Res. 27, 455-463 (1993).
- Penners, G., Priel, Z. und Silberberg, A., Irreversible adsorption of triple-helical soluble collagen monomers from solution to glass and other surfaces, J. Coll. Interf. Sci. 80, 437-444 (1981).

- Phillips, M.C., Interactions of apolipoproteins at interfaces, in: *Structure and Function of Apolipoproteins*, Rosseneu, M., Hrsg. (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992), S.185-216.
- Poehling, H.-M. und Neuhoﬀ, V., Visualization of proteins with a silver "stain": A critical analysis, *Electrophoresis* 2, 141-147 (1981).
- Pommier, C.G., O'Shea, J., Chused, T., Yancey, K., Frank, M.M., Takahashi, T. und Brown, E.J., Studies on the fibronectin receptors of human peripheral blood leukocytes, morphological and functional characterization, *J. Exp. Med.* 159, 137-151 (1984).
- Porter, C.J.H., Moghimi, S.M., Davies, M.C., Davis, S.S. und Illum, L., Differences in the molecular weight profile of poloxamer 407 affect its ability to redirect intravenously administered colloids to the bone marrow, *Int. J. Pharm* 83, 273-276 (1992).
- Poste, G. und Kirsh, R., Site specific (targeted) drug delivery in cancer chemotherapy, *Biotechnol.* 1, 869-878 (1983).
- Pownall, H.J. und Gotto, A.M., Jr., Human plasma apolipoproteins in biology and medicine, in *Structure and Function of Apolipoproteins*, Rosseneu, M., Hrsg. (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992), S.1-32.
- Putnam, F.W., Alpha, beta, gamma, omega - The structure of the plasma proteins, in *The Plasma Proteins, Structure, Function, and Genetic Control, Vol. IV*, Putnam, F.W., Hrsg. (Academic Press, Inc., New York, 1984a), S. 46-167.
- Putnam, F.W., Progress in plasma proteins, in *The Plasma Proteins, Structure, Function, and Genetic Control, Vol IV*, Putnam, F.W., Hrsg. (Academic Press, Inc., New York, 1984b), S. 2-45.
- Rapoza, R.J. und Horbett, T.A., The effects of concentration and adsorption time on the elutability of adsorbed proteins in surfactant solutions of varying structures and concentrations, *J. Coll. Interf. Sci.* 136, 480-493 (1990).
- Reynolds, J.A. und Tanford, C., Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 1002-1003 (1970).
- Righetti, P.G., Tudor, G. und Gianazza, E., Effect of 2-mercaptoethanol on pH gradients in isoelectric focusing, *J. Biochem. and Biophys. Meth.* 6, 219-227 (1982).
- Rolland, A., Bourel, D., Genetet, B. und Le Verge, R., Monoclonal antibodies covalently coupled to polymethacrylic nanoparticles: in vitro targeting to human lymphocytes, *Int. J. Pharm.* 39, 173-180 (1987).
- Rosseneu, M., Vanloo, B., Lins, L., De Pauw, M., Ruyschaert, J.-M. und Brasseur, R., Analysis of the primary and of the secondary structure of the apolipoproteins, in: *Structure and Function of Apolipoproteins*, Rosseneu, M., Hrsg. (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992) S.159-183.

- Scanu, A.M., Plasma apolipoproteins: Gene structure, function, and variants, in *The Plasma Proteins, Structure, Function, and Genetic Control, Vol.V*, Putnam, F.W., Hrsg. (Academic Press, Inc., New York, 1987), S. 141-190.
- Schmaier, A.H., Silver, L., Adams, A.L., Fischer, G.C., Munoz, P.C., Vroman, L. und Coleman, R.W., The effect of high molecular weight kininogen on surface-adsorbed fibrinogen, *Thromb. Res.* 33, 51-67 (1984).
- Schmitz, G. und Lackner, K.J., High-density lipoproteins and atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* 4, 392-400 (1993).
- Schwick, H.G. und Haupt, H., Human plasma proteins of unknown function, in *The Plasma Proteins Vol. IV*, Putnam, F.W., Hrsg. (Academic Press, Inc., New York, 1984), S. 168-219.
- Scieszka, J.F., Maggiora, L.L., Wright, S.D. und Cho, M.J., Role of complements C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils, *Pharm. Res.* 8, 65-69 (1991).
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. und Maizel, J.V., Jr., Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-822 (1967).
- Shen, B.W., Lipid-protein interaction at solid-water interface, *J. Biol. Chem.* 260, 1032-1039 (1985).
- Sherman, L.A. und Lee, J., Specific binding of soluble fibrin to macrophages, *J. Exp. Med.* 145, 76-85 (1977).
- Shirahama, H. und Suzawa, T., Adsorption of bovine serum albumin onto styrene/acrylic acid copolymer latex, *Coll. Polym. Sci.* 263, 141-146 (1985).
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150, 76-85 (1985).
- Stenius, P., Berg, J., Claesson, P., Gölander, C.G., Herder, C. und Kronberg, B., Nonionic hydrophilic surfaces: Adsorption and interactions, *Croat. Chem. Acta* 63, 501-516 (1990).
- Svensson, H., Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases, *Acta Chem. Scan.* 15, 325-341 (1961).
- Svensson, H., Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. II. Buffering capacity and conductance of isoionic ampholytes, *Acta Chem. Scan.* 16, 456-466 (1962).
- Tan, J.S. und Martic, P.A., Protein adsorption and conformational change on small polymer particles, *J. Coll. Interf. Sci.* 136, 415-431 (1990).

- Tenkanen, H. und Ehnholm, C., Molecular biology of apolipoprotein A-IV, *Curr. Opin. Lipidol.* 4, 95-99 (1993).
- Tracy, R.P., Currie, R.M. und Young, D.S., Two-dimensional gel electrophoresis of serum specimens from a normal population, *Clin. Chem.* 28, 890-899 (1982).
- Tröster, S.D., Wallis, K., Müller, R.H. und Kreuter, J., Correlation of the surface hydrophobicity of ^{14}C -poly (methyl methacrylate) nanoparticles to their body distribution, *J. Control. Rel.* 20, 247-260 (1992).
- Uniyal, S. und Brash, J.L., Patterns of adsorption of proteins from human plasma onto foreign surfaces, *Thromb. Haemostas.* 47, 285-290 (1982).
- Van Berkel, Th.J.C., Drug targeting: application of endogenous carriers for site-specific delivery of drugs, *J. Control. Rel.* 24, 145-155 (1993).
- Van Dulm, P. und Norde, W., The adsorption of human plasma albumin on solid surfaces, with special attention to the kinetic aspects, *J. Coll. Interf. Sci.* 91, 248-255 (1983).
- Van Leuven, F., Marynen, P., Sottrup-Jensen, Cassiman, J.-J. und Van Den Berghe, H., The receptor-binding domain of human α_2 -macroglobulin. Isolation after limited proteolysis with a bacterial proteinase, *J. Biol. Chem.* 261, 11369-11373 (1986).
- Van Oss, C.J., Gillman, C.F. und Neumann, A.W., *Phagocytic Engulfment and Cell Adhesiveness as Cellular Surface Phenomena*, (Marcel Dekker, New York, 1975).
- Vesterberg, O., Synthesis and isoelectric fractionation of carrier ampholytes, *Acta Chem. Scan.* 23, 2653-2666 (1969).
- Vo, K.-P., Miller, M.J., Geiduschek, E.P., Nielsen, C., Olson, A. und Xuong, N.H., Computer analysis of two-dimensional gels, *Anal. Biochem.* 112, 258-271 (1981).
- Vogel, W., Bomford, A., Young, S. und Williams, R., Heterogeneous distribution of transferrin receptors on parenchymal and nonparenchymal liver cells. Biochemical and morphological evidence, *Blood* 69, 264-270 (1987).
- Voris, B.P. und Young, D.A., Very-high-resolution two-dimensional gel electrophoresis of proteins using giant gels, *Anal. Biochem.* 104, 478-484 (1980).
- Vroman, L. und Adams, A.L., Adsorption of proteins out of plasma and solutions in narrow spaces, *J. Coll. Interf. Sci.* 111, 391-402 (1986).
- Vroman, L., Adams, A.L., Fischer, G.C. und Munoz, P.C., Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces, *Blood* 55, 156-159 (1980).
- Wallis, K.H. und Müller, R.H., Stabilität von Poloxamer und Poloxamine Coatingfilmen auf Polystyrol Nanopartikeln, *Acta Pharm. Technol.* 36, 127-132 (1990).

Walsh, J. und Gosling, J.P., The influence of radioiodination on the adsorption of IgG and serum albumin to polystyrene, *Anal. Biochem.* 158, 413-423 (1986).

Weiner, B.B., Particle and droplet sizing using Fraunhofer diffraction, in *Modern Methods of Particle Size Analysis*, Barth, H.G., Hrsg. (Wiley & Sons, New York, 1984), S.135-172.

Wesemeyer, H., *Mikrokalorimetrische und chromatographische Untersuchungen zur Oberflächenmodifikation von partikulären Arzneistoffträgern durch Tenside*, Dissertation (Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 1993).

Westermeier, R., *Elektrophorese-Praktikum* (VCH, Weinheim, 1990).

Westermeier, R., Schickle, H. Thesseling, G. und Walter, W.W., Densitometrie von Gelelektrophoresen, *GIT Lab.-Med.* 4, 194-202 (1988).

Wilkins, D.J. und Myers, P.A., Studies on the relationship between the electrophoretic properties of colloids and their blood clearance and organ distribution in the rat, *Brit. J. Exp. Path.* 47, 568-576 (1966).

Woodle, M., Storm, G., Newman, M.S., Collins, L.R., Szoka, F. und Martin, F.J., Prolonged delivery of vasopressin by long circulating liposomes, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 18, 103-104 (1991).

Zilversmit, D.B., Boyd, G.A. und Brucer, M., The effect of particle size on blood clearance and tissue distribution of radioactive gold colloids, *J. Lab. Clin. Med.* 40, 255-260 (1952).

Zsom, R.L.J., Dependence of preferential bovine serum albumin oligomer adsorption on the surface properties of monodisperse polystyrene latices, *J. Coll. Interf. Sci.* 111, 434-445 (1986).

Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Professor Rainer H. Müller aussprechen für die begeisternde Hinführung zum Drug Targeting, die innovative Aufgabenstellung und die großen Freiräume, die mir die effektive Bearbeitung ermöglichten.

Ich danke Professor Bernd W. Müller für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in der Pharmazeutischen Technologie und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Thomas Bock gilt mein besonderer Dank, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Fettemulsionen, vielmehr aber noch für zahllose Gespräche und Auseinandersetzungen über das Leben als solches.

Erst durch das Engagement von Martin Lück und Astrid Calvör sowie Julia Diederichs und Heike Betinski-Eggert ist die Durchführung des Projektes in dieser Form möglich geworden ("Guten Morgen ..."). Mir hat die Arbeit mit "meiner" kleinen Arbeitsgruppe riesigen Spaß gemacht. Dafür Euch meinen herzlichen Dank.

Den Herren Christoph Berger, Stefan Lucks und Folker Ruchatz gilt mein spezieller Dank schon für ihre bloße Anwesenheit und die vielen gemeinsamen Erlebnisse innerhalb und außerhalb des Instituts.

Ich möchte mich bei Dr. Denis F. Hochstrasser und seiner Arbeitsgruppe für die Einführung in die Geheimnisse der 2D-PAGE und erlebnisreiche Fahrten nach Genf bedanken. Die bereitwilligen Hilfestellungen von Christian Pasquali, Jean-Charles Sanchez, Olivier Golaz und Ron Appel haben mir den Einstieg in die neue Arbeitstechnik wesentlich erleichtert.

Ohne das Wissen und die Unterstützung von Arne Sinn hätte manche Unklarheit auf dem PC wohl länger Bestand gehabt, vom UNIX-System ganz zu schweigen. Danke für Deine Hilfe. Rüdiger Smal gilt mein Dank für Photographien, Dias und Zeichnungen, die trotz manchmal überhöht erscheinender Ansprüche meinerseits meist klaglos und mit viel Akribie angefertigt wurden. Dirk Böhme möchte ich für das grandios gebaute IGR danken. Als sehr erfreulich habe ich die Zusammenarbeit mit den Biochemikern des Hauses empfunden, insbesondere Rüdiger Lomb und Thomas Kunze gilt hierfür mein Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Uta. Sich Deines Rückhaltes bewußt zu sein, macht vieles einfacher. Danke, Nele und Henrik. Durch Euch wird manches, was so immens wichtig erscheint, auf wundersame Weise relativiert.

